



**TUGAS AKHIR - SB141510**

# **POTENSI *Bacillus* SEBAGAI BAKTERI SIDEROFOR DAN *BIOREMOVAL* LOGAM BESI (Fe)**

**SEPTA TRI FARISNA  
1511 100 051**

**Dosen Pembimbing  
Dr. Enny Zulaika, MP  
Nur Laili, S. Si., M. Si**

**Jurusan Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Surabaya 2015**



**FINAL PROJECT - SB141510**

**SIDEROPHORE PRODUCTION AND  
REDUCTION OF FERRIC IRON BY *Bacillus*  
ISOLATED FROM KALIMAS SURABAYA**

**SEPTA TRI FARISNA  
1511 100 051**

**Supervisor  
Dr. Enny Zulaika, MP  
Nur Laili, S. Si., M. Si**

**Biology Department  
Mathematics and Natural Science Faculty  
Sepuluh Nopember Institute Of Technology  
Surabaya 2015**

## LEMBAR PENGESAHAN

### POTENSI *Bacillus* SEBAGAI BAKTERI SIDEROFOR DAN BIOREMOVAL LOGAM BESI (Fe)

#### TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains  
pada  
Jurusan S-1 Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Oleh:

**SEPTA TRI FARISNA**  
**NRP. 1511 100 051**

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir:

Dr. Enny Zulaika, M.P. .... (Pembimbing 1)

Nur Laili, S. Si., M. Si. .... (Pembimbing 2)

Surabaya, 27 Juli 2015

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi



Dr. rer. nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si  
NRP. 19690907 199803 2 001

POTENSI *Bacillus* SEBAGAI BAKTERI SIDEROFOR DAN  
BIOREMOVAL LOGAM BESI (Fe)

Nama : Septa Tri Farisna  
NRP : 1511 100 051  
Jurusan : Biologi  
Dosen Pembimbing : Dr. Enny Zulaika, MP  
Nur Laili, S. Si., M. Si

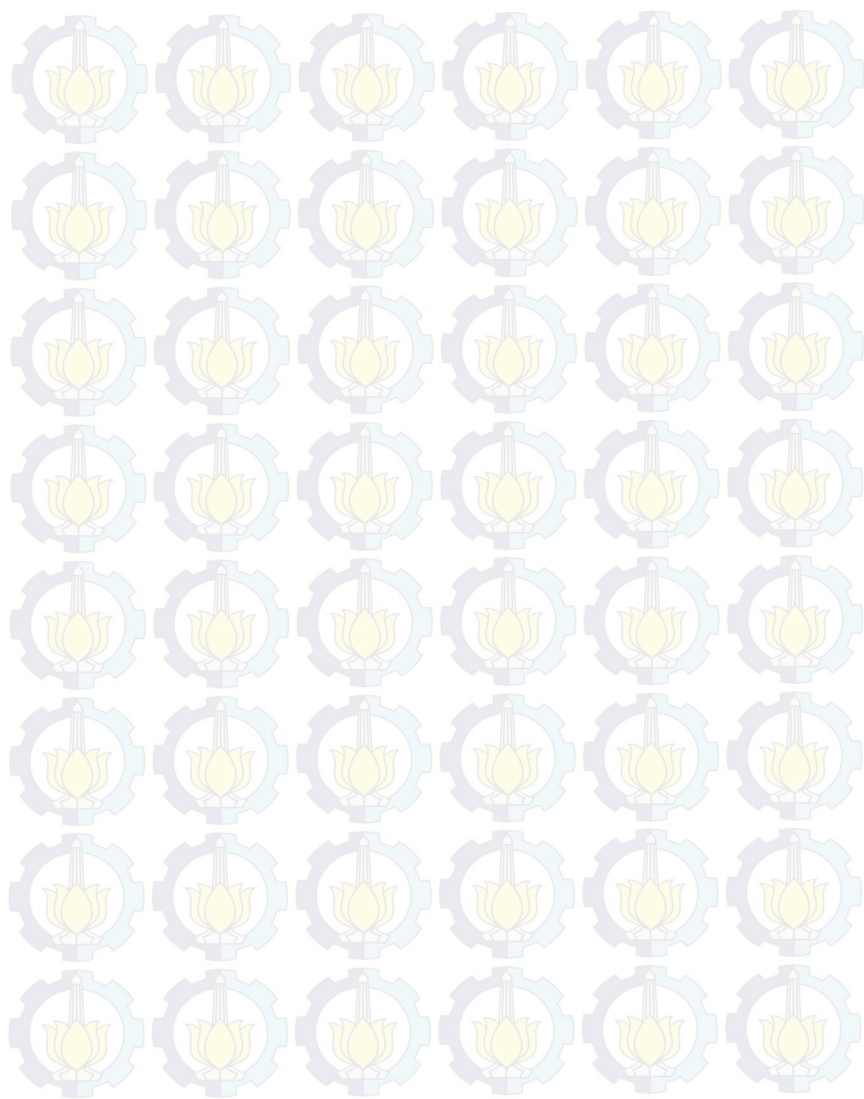
Abstrak

*Beberapa strain Bacillus mampu menghasilkan siderofor. Siderofor adalah senyawa pengkelat logam besi sebagai respon kekurangan besi. Bacillus juga berpotensi sebagai bioremoval logam besi. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan Bacillus siderofor yang resisten logam besi dan mengetahui kemampuan bioremovalnya.*

*Isolat bakteri yang digunakan adalah Bacillus endogenik Kalimas Surabaya. Penapisan bakteri siderofor pada medium Fe-CAS Agar. Uji resistensi dilakukan pada media nutrient agar-FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O dimulai dari 5 mg/L dan seterusnya. Uji bioremoval besi dilakukan pada konsentrasi 9,496; 33,365; dan 33,594 mg/L. Uji viabilitas dilakukan dengan menumbuhkan isolat yang telah terpapar besi pada medium nutrient agar tanpa FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O.*

*Bacillus A6, DA11, dan SS19 dapat menghasilkan siderofor dan resisten Fe<sup>3+</sup> 33,594 mg/L. Bacillus DA11 dapat meremoval Fe<sup>3+</sup> paling tinggi, yaitu 27,967 mg/L pada konsentrasi 33,594 mg/L dengan efisiensi bioremoval 83%. Semua Bacillus mempunyai daya hidup setelah terpapar logam Fe dengan CFU ≥ 300.*

*Kata Kunci : Bacillus, Bioremoval, FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, Siderofor*





SIDEROPHORE PRODUCTION AND REDUCTION OF  
FERRIC IRON BY *Bacillus* ISOLATED FROM KALIMAS  
SURABAYA

**Student Name** : Septa Tri Farisna  
**NRP** : 1511 100 051  
**Department** : Biology  
**Supervisor** : Dr. Enny Zulaika, MP  
Nur Laili, S. Si., M. Si

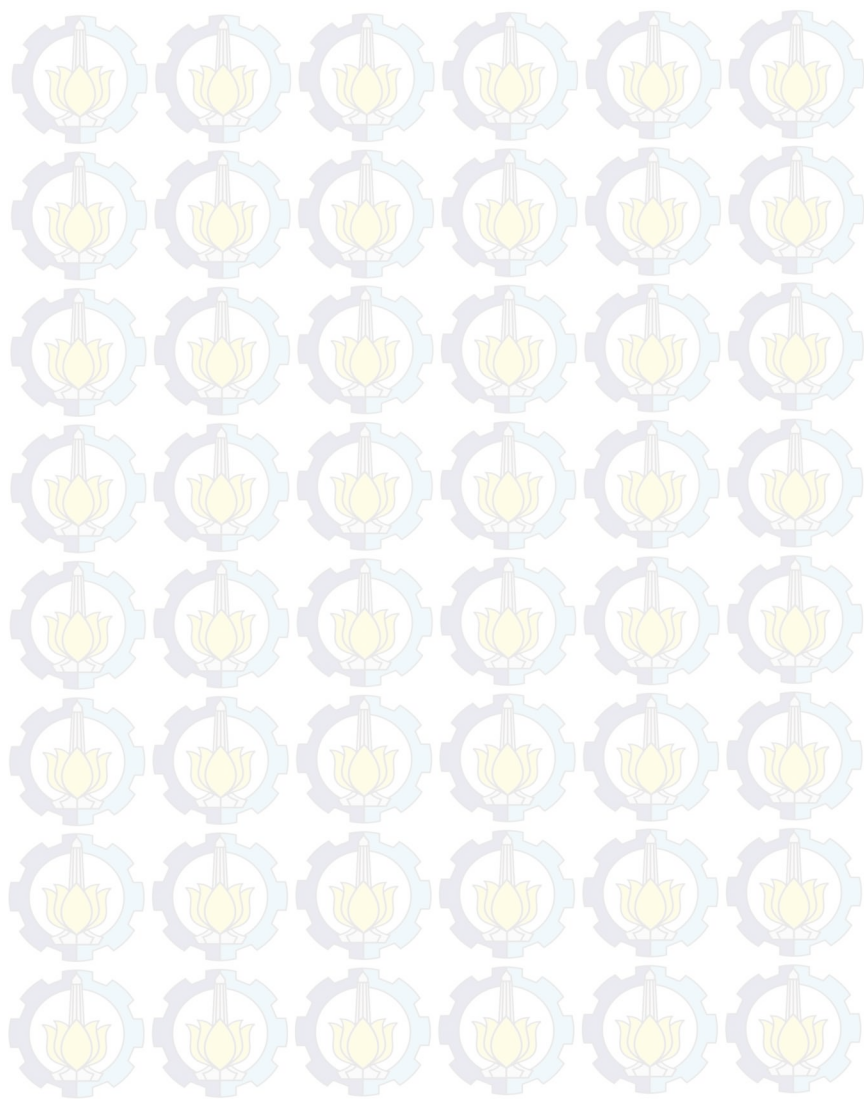
**Abstract**

Some *Bacillus* strains can produce siderophore. Siderophore is a chelating agent for ferric iron as a response to low iron environment. *Bacillus* also has potency as iron bioremoval. The aim of this research is to get siderophore *Bacillus* strain which can resist to iron and to know the ability of its bioremoval.

This research used *Bacillus* isolated from Kalimas Surabaya ie: A6, DA11, S1, S6, and SS19. The strains were screened for siderophore bacteria in Fe-CAS Agar medium. Resistance test used nutrient agar- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  in 5 mg/L and so on. Ferric bioreduction test was applied in 9,496; 33,365; and 33,594 mg/L. The strains from Ferric bioremoval test were grown in nutrient agar medium without  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

*Bacillus* A6, DA11, and SS19 could produce siderophore and also resisted to 33,594 mg/L  $\text{Fe}^{3+}$ . *Bacillus* DA11 had the highest ability of Ferric bioreduction, which was 27,967 mg/L from 33,594 mg/L Ferric with efficiency 83%. All *Bacillus* had high viability after growing in Fe containing medium with CFU  $\geq 300$ .

**Keywords** : *Bacillus*, Bioremoval,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Siderophore



## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmatNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul **Potensi *Bacillus* Sebagai Bakteri Siderofor dan *Bioremoval* Logam Besi (Fe).** Penyusunan tugas akhir ini merupakan suatu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

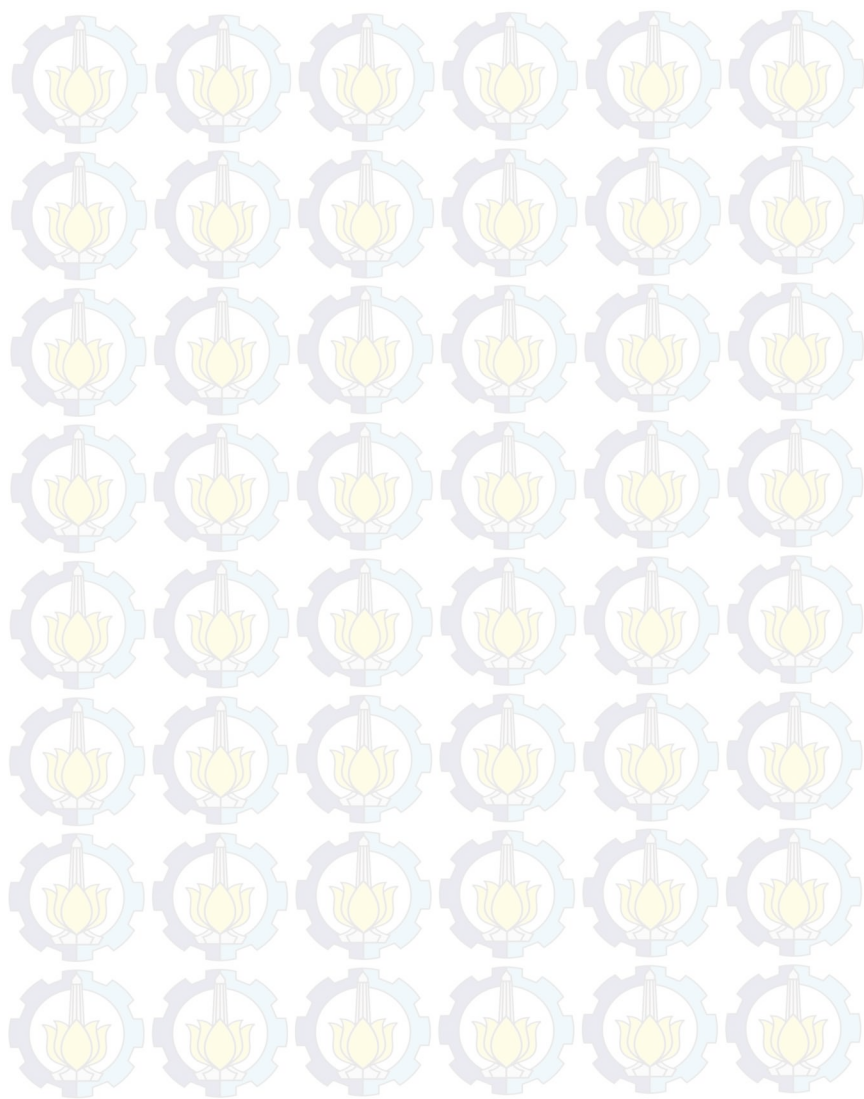
Penelitian ini didukung dengan dana penelitian PUPT melalui PNBP ITS tahun anggaran 2015 sesuai nomor kontrak 003246.IT2.11/PN.08/2015. Sebagian penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pertanian, Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI dan didanai oleh Proyek DIPA Tematik LIPI Tahun Anggaran 2015. Dalam penyusunan tugas akhir ini tidak lepas dari bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Enny Zulaika, MP. selaku pembimbing I, Nur Laili, S. Si, M. Si selaku pembimbing II, serta dosen penguji, Dra. Nurlita Abdulgani M. Si., dan Nur Hidayatul Alami, S. Si., M. Si. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Ibu dan kakak-kakak atas doa dan semangatnya, teman tim riset Bioremediasi dan *Biofertilizer* serta teman-teman angkatan 2011, dan seluruh pihak yang telah membantu.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam tugas akhir ini, namun besar harapan tugas akhir ini dapat bermanfaat untuk masyarakat luas.

Surabaya, 4 Agustus 2015

Septa Tri Farisna





## DAFTAR ISI

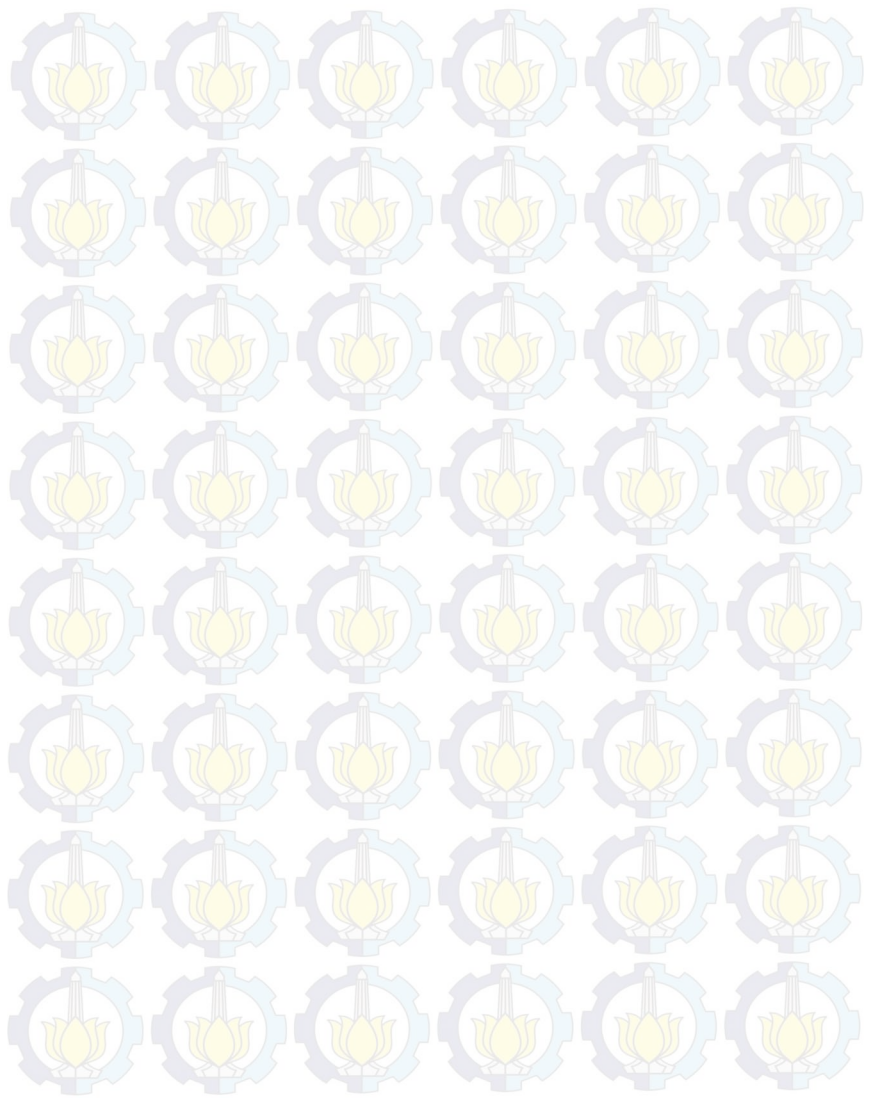
	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN.....	i
ABSTRAK.....	iii
<i>ABSTRACT</i> .....	v
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Permasalahan .....	2
1.3 Batasan Masalah .....	2
1.4 Tujuan .....	2
1.5 Manfaat .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Genus <i>Bacillus</i> . ....	5
2.2 Logam Besi (Fe) .....	6
2.3 Resistensi.....	7
2.4 Siderofoor.....	7
2.5 <i>Bioremoval</i> .....	9
<b>BAB III METODOLOGI</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	11
3.2 Metode Penelitian.....	11
3.2.1 Bakteri yang Digunakan.....	11
3.2.2 Uji Rekonfirmasi <i>Bacillus</i> .....	11
3.2.3 Penapisan Bakteri Siderofoor.....	12
3.2.4 Uji Resistensi dan <i>Range Finding Test</i> Isolat	

Terhadap $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	12
3.2.5 Uji Viabilitas Isolat Terhadap Cekaman Logam Fe.....	13
3.2.6 Penentuan Umur Isolat Untuk Uji <i>Bioremoval</i> Fe.....	14
3.2.7 Uji <i>Bioremoval</i> Fe.....	15
3.2.8 Viabilitas <i>Bacillus</i> .....	16
3.3 Rancangan Penelitian dan Analisa Data.....	17
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Rekonfirmasi <i>Bacillus</i> .....	19
4.2 Penapisan Bakteri Siderofor.....	21
4.3 Uji Resistensi <i>Bacillus</i> Terhadap Logam Besi (Fe)	24
4.4 Viabilitas <i>Bacillus</i> Pada Medium Tercekam Logam Fe.....	27
4.5 Penentuan Umur Isolat Untuk Perlakuan <i>Bioremoval</i> .....	30
4.6 Uji <i>Bioremoval</i> Fe.....	32
4.7 Uji Viabilitas <i>Bacillus</i> .....	34
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	37
5.2 Saran.....	37
 DAFTAR PUSTAKA.....	39
LAMPIRAN.....	47
BIODATA PENULIS.....	71

## DAFTAR GAMBAR

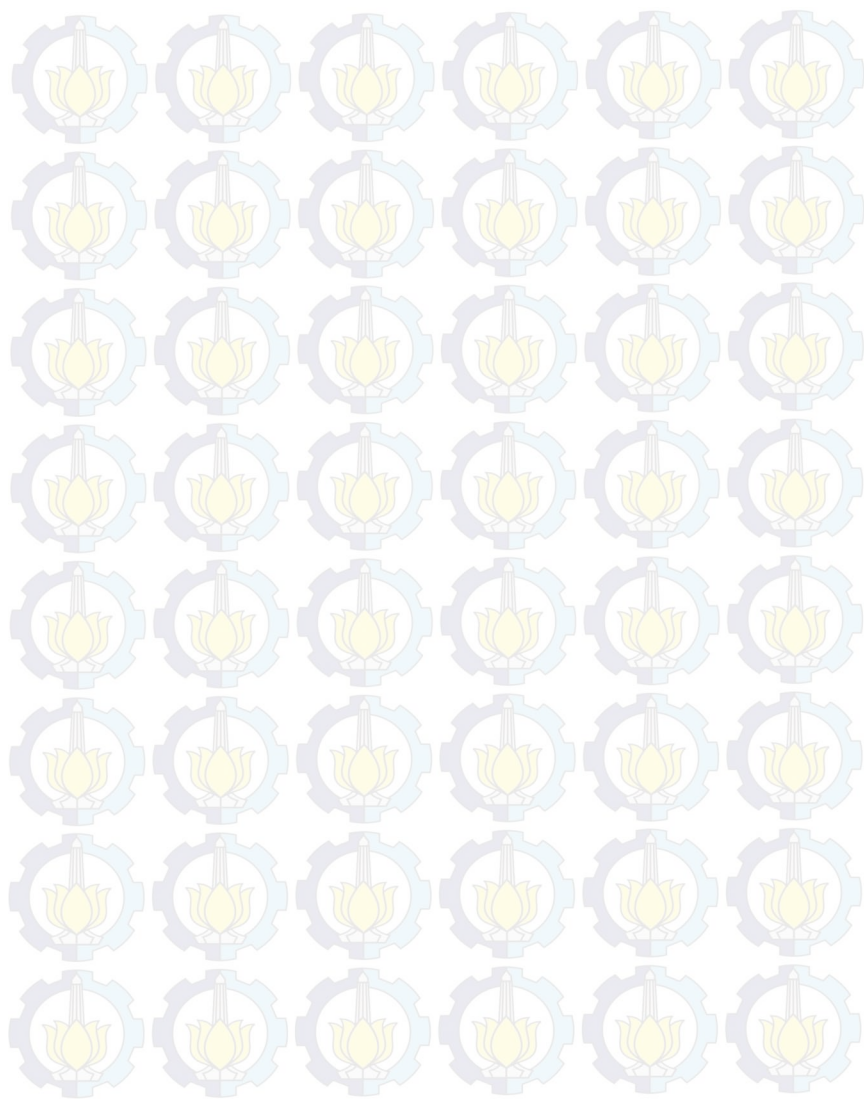
	Halaman
Gambar 2.1 <i>Bacillus</i> spp.....	5
Gambar 2.2 Struktur Molekul Siderofor yang Diproduksi oleh Spesies <i>Bacillus</i> .....	9
Gambar 4.1 Hasil Uji Siderofor Setelah Inkubasi 48 Jam.....	21
Gambar 4.2 Hasil Uji Resistensi <i>Bacillus</i> Pada Konsentrasi Fe 300 mg/L.....	25
Gambar 4.3 Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus</i> A6 yang Terpapar Logam Fe.....	27
Gambar 4.4 Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus</i> DA11 yang Terpapar Logam Fe.....	28
Gambar 4.5 Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus</i> S6 yang Terpapar Logam Fe.....	28
Gambar 4.6 Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus</i> SS19 yang Terpapar Logam Fe.....	29
Gambar 4.7 Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus</i> A6, DA11, dan SS19 Pada Medium <i>Nutrient Broth</i> Tanpa Logam Fe.....	31
Gambar 4.8 Persentase Efisiensi <i>Bioremoval</i> Fe oleh <i>Bacillus</i> .....	34





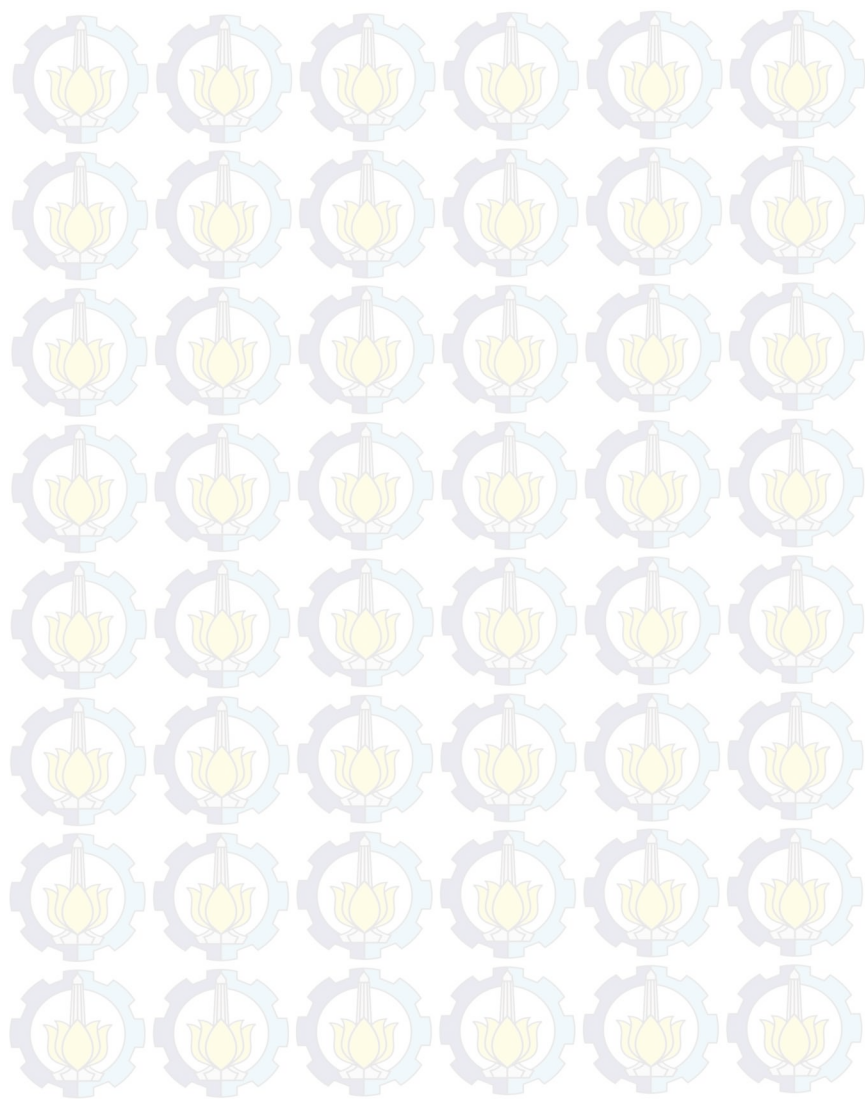
## DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	Komposisi Medium NA dan NB.....	47
Lampiran 2	Pembuatan Medium Fe-CAS Agar....	48
Lampiran 3	Uji Rekonfirmasi.....	50
Lampiran 4	Skema Kerja.....	52
Lampiran 5	Dokumentasi Hasil.....	54
Lampiran 6	Analisa Data MANOVA dengan Minitab.....	69
Lampiran 7	Hasil Analisis AAS.....	70



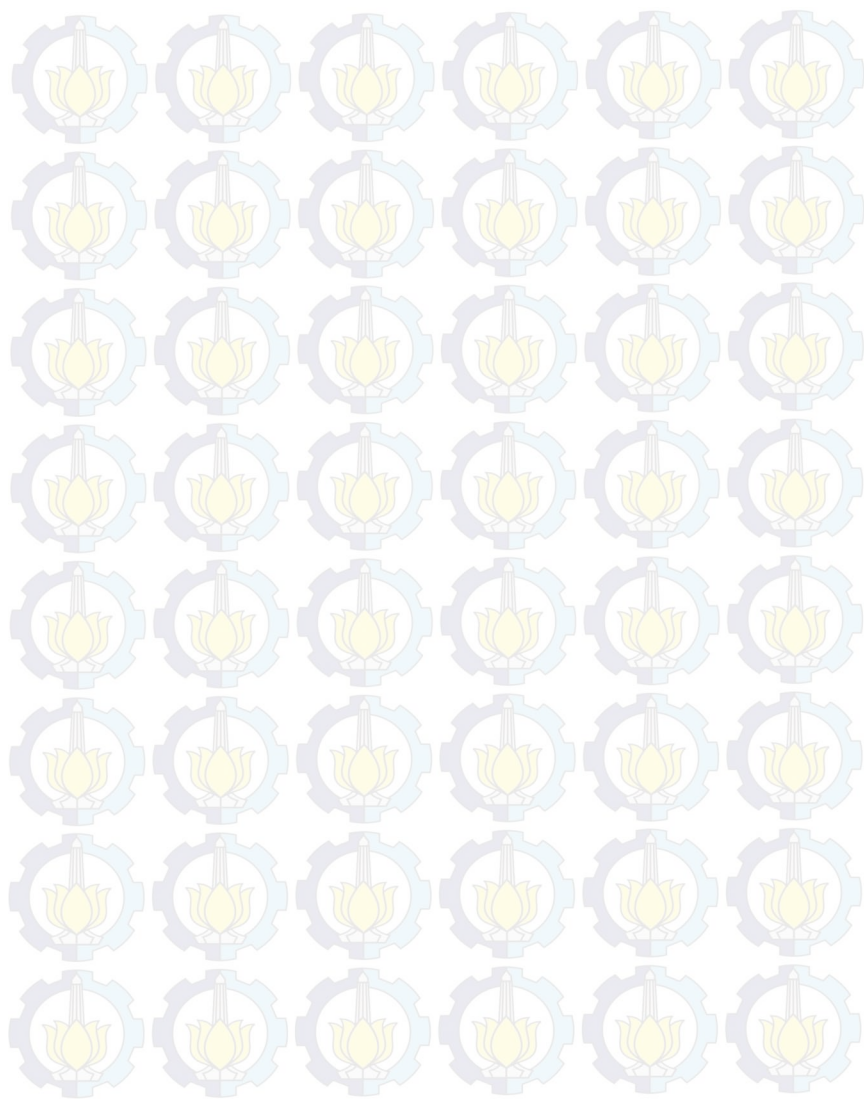
		Halaman
Tabel 4.1	Hasil Uji Rekonfirmasi <i>Bacillus</i> spp.....	19
Tabel 4.2	Hasil Penapisan Bakteri Siderofor.....	22
Tabel 4.3	Hasil Uji Resistensi FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	25
Tabel 4.4	Kepadatan Sel <i>Bacillus</i> (Inkubasi 12 jam).....	32
Tabel 4.5	Konsentrasi Fe Perlakuan.....	33
Tabel 4.6	Hasil Uji <i>Bioremoval</i> Fe.....	33
Tabel 4.7	Hasil Uji Viabilitas <i>Bacillus</i> .....	35





## DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	Komposisi Medium NA dan NB.....	47
Lampiran 2	Pembuatan Medium Fe-CAS Agar....	48
Lampiran 3	Uji Rekonfirmasi.....	50
Lampiran 4	Skema Kerja.....	52
Lampiran 5	Dokumentasi Hasil.....	54
Lampiran 6	Analisa Data MANOVA dengan Minitab.....	69
Lampiran 7	Hasil Analisis AAS.....	70



## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Salah satu genus prokariota yang melimpah adalah *Bacillus* (Elder *et al.*, 2005). Karakter umum anggota genus *Bacillus* adalah berbentuk batang (Dworkin *et al.*, 2006), Gram positif, bersifat aerobik atau anaerobik fakultatif, katalase positif, dan membentuk endospora (Claus & Berkeley dalam Patel *et al.*, 2008). Beberapa strain anggota genus *Bacillus* dilaporkan memiliki potensi resisten terhadap logam berat seperti Hg, Pb, Cu, dan Cd (Zulaika *et al.*, 2012). Resistensi bakteri terhadap logam dapat melalui mekanisme biosorpsi dan bioakumulasi. Mekanisme biosorpsi merupakan proses pasif sehingga logam tidak meracuni bakteri, sedangkan mekanisme bioakumulasi merupakan proses aktif dimana logam berat dapat meracuni sel bakteri (Chojnacka, 2010).

Siderofor merupakan senyawa pengkelat yang dihasilkan bakteri dan dilepas ke luar sel untuk mengkelat logam besi (Madigan *et al.*, 2012) sebagai respon kekurangan besi dan untuk mendapatkan besi (Zawadzka *et al.*, 2009). Siderofor juga dapat digunakan untuk menyembunyikan logam Fe di lingkungan rhizosfer sehingga tidak tersedia bagi perkembangan mikroba patogen (Husen, 2007). Siderofor mampu membentuk kompleks dengan Ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dan menyalurkannya ke dalam sel (Prescott *et al.*, 2008).

Beberapa bakteri yang ditemukan sebagai penghasil siderofor di antaranya *Pseudomonas fluorescens* (Fgaier & Eberl, 2011), *Streptococcus phocae* (Retamales *et al.*, 2012), *Erwinia chrysanthemi* (Riquelme dalam Varma & Chincholkar, 2007), *Methylobacterium extorquens* (Silva-Stenico *et al.*, 2005), *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio fluvialis* (Varma & Chincholkar, 2007), dan *Bacillus* (Zawadzka *et al.*, 2009) seperti *Bacillus anthracis* dan *Bacillus cereus* (Pandey *et al.*, 2012).



*Bacillus* yang diisolasi dari Kalimas Surabaya (isolat A6, S1, S6, SS19, dan DA11) merupakan genera yang resisten logam Hg, Pb, Cd, dan Cu (Zulaika *et al.*, 2012). *Bacillus* tersebut belum diteliti resistensinya terhadap logam Fe dan potensinya sebagai bakteri siderofor sekaligus sebagai agen *bioremoval* logam Fe.

## 1.2 Permasalahan

Berdasarkan latar belakang di atas, permasalahan pada penelitian ini adalah:

1. Apakah *Bacillus* endogenik Kalimas Surabaya dapat berpotensi sebagai bakteri siderofor?
2. Jika merupakan bakteri siderofor, bagaimanakah resistensinya terhadap logam Fe?
3. Jika resisten terhadap logam Fe, bagaimana kemampuan *bioremoval*nya terhadap logam Fe?

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Penelitian dilakukan dalam skala laboratorium.
2. Bakteri *Bacillus* yang digunakan yaitu anggota genus *Bacillus*, isolat A6, S1, S6, SS19, DA11, dan *Bacillus cereus* ATCC 1178.
3. Logam besi (Fe) yang digunakan adalah senyawa  $\text{FeCl}_3$ .
4. Pengukuran konsentrasi  $\text{FeCl}_3$  menggunakan AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometry*).

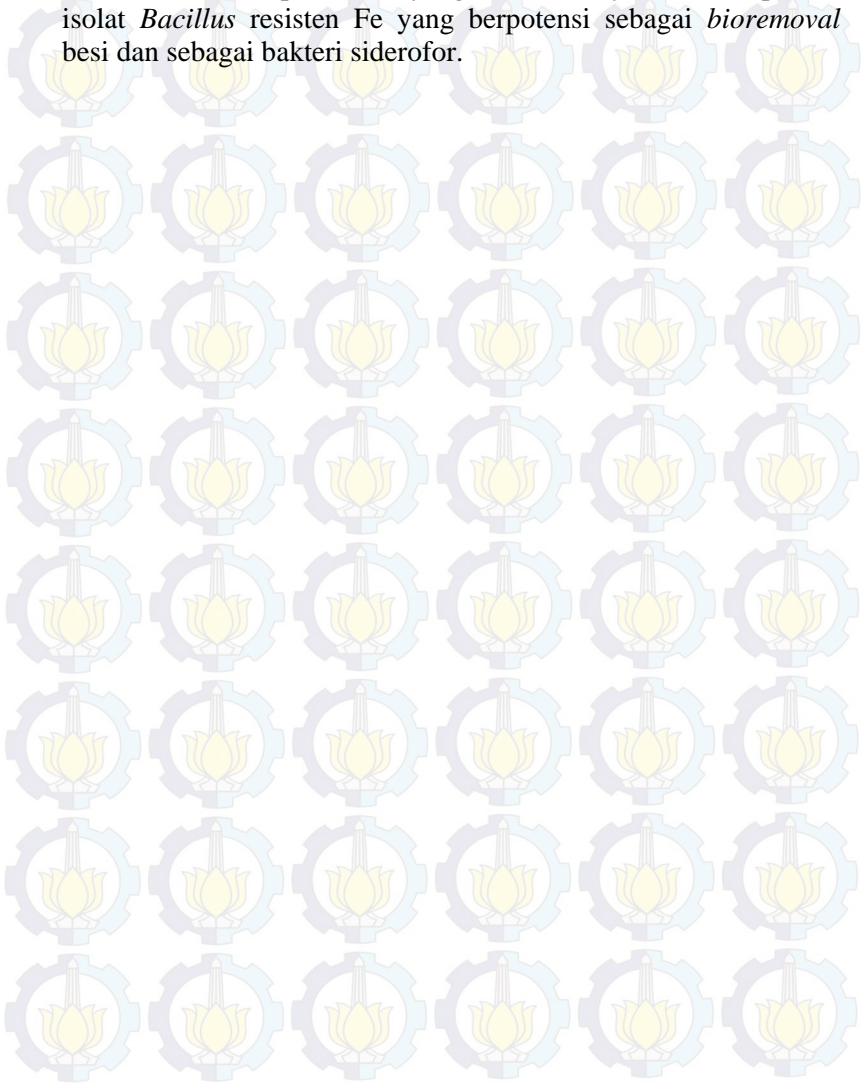
## 1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah untuk:

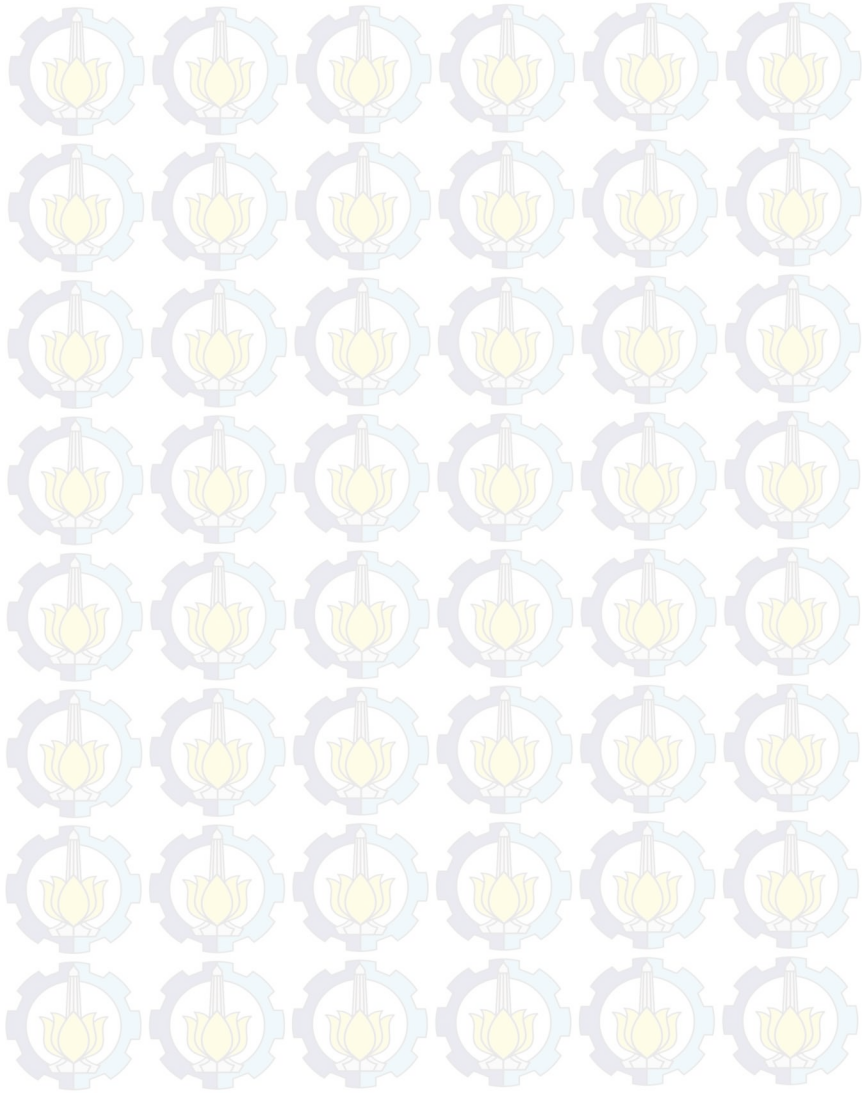
1. Mendapatkan isolat bakteri yang bersifat siderofor.
2. Mendapatkan isolat bakteri yang resisten logam Fe.
3. Mengetahui kemampuan *bioremoval* Fe pada isolat bakteri siderofor.

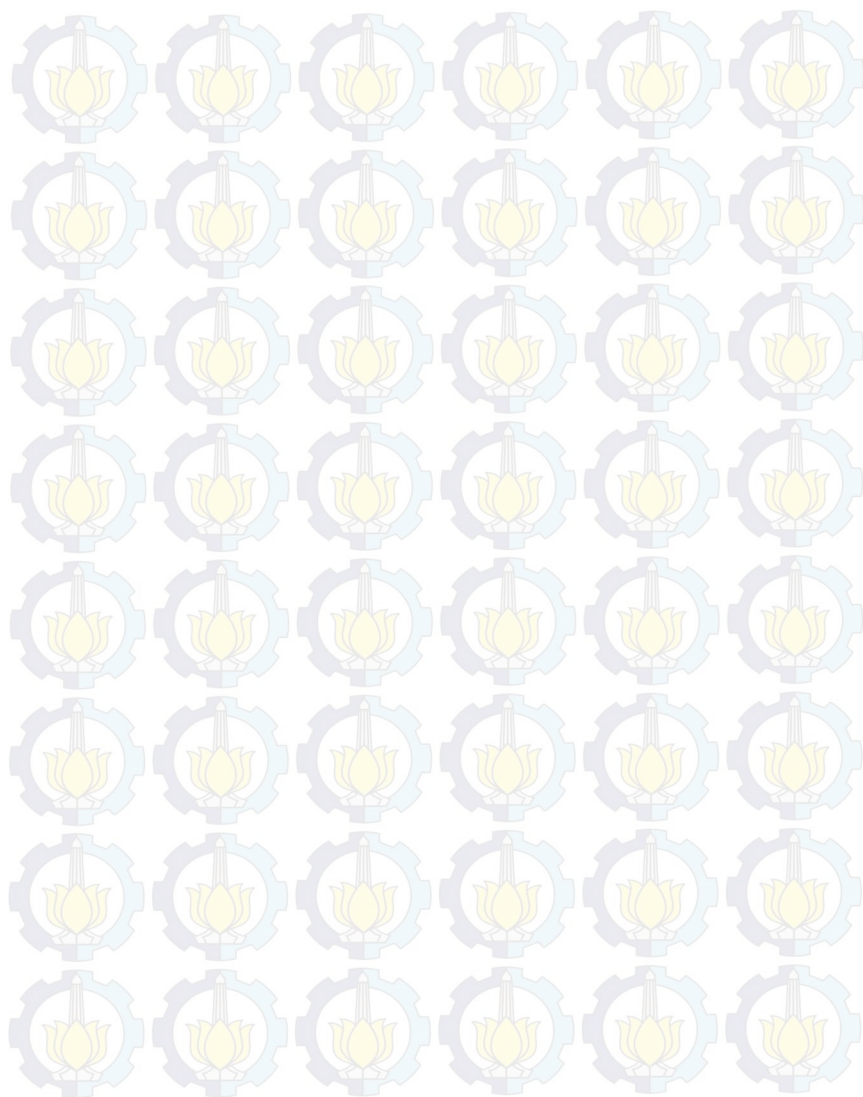
### 1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian yang dilakukan yaitu mendapatkan isolat *Bacillus* resisten Fe yang berpotensi sebagai *bioremoval* besi dan sebagai bakteri siderofor.



**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**







## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Genus *Bacillus*

Genera *Bacillus* merupakan genera yang tergolong melimpah di alam (Elder *et al.*, 2005). Beberapa karakter yang membedakan genus ini dengan genus bakteri yang lain yaitu produksi endospora yang berbentuk bulat, oval, atau silindris (Gambar 2.1). Spora bersifat tahan terhadap temperatur tinggi serta memiliki siklus pembentukannya sendiri dari sel vegetatif menjadi spora dan dari spora menjadi sel vegetatif (Keynan & Sandler dalam Dworkin *et al.*, 2006). Selain endospora, karakter umum lainnya dari genus *Bacillus* adalah berbentuk batang (Dworkin *et al.*, 2006), Gram positif, bersifat aerobik atau anaerobik fakultatif, katalase positif, dan membentuk endospora berbentuk batang (Claus & Berkeley dalam Patel *et al.*, 2008). Pada permukaan sel beberapa strain *Bacillus* terdapat lapisan yang terdiri dari protein atau glikoprotein yang disebut dengan lapisan S (Dworkin *et al.*, 2006). Tidak semua spesies *Bacillus* memiliki lapisan S. Fungsi dari lapisan S tersebut diperkirakan memiliki peranan penting pada interaksi bakteri dengan logam (Sleytr & Messner dalam Dworkin *et al.*, 2006).



Gambar 2.1 *Bacillus* spp. (Prescott *et. al.*, 2008; Schwartz., 2009).

Bakteri genus *Bacillus* memiliki beberapa kemampuan seperti memproduksi enzim alginase pada *B. stearoothermophilus* (Hansen *et al.*, 1984), *B. circulans* mampu mendegradasi fenol (Dong *et al.*, 1992). Selain itu, penelitian pada *B. cereus* menyatakan bahwa bakteri tersebut mampu hidup (resisten) dalam medium yang mengandung Pb dari konsentrasi 0,5-7 ppm, logam Cu (0,5-8 ppm), logam As (0,5-10 ppm), logam Fe (0,5-8 ppm), dan logam Mn (0,5-10 ppm) (Kanwal *et al.*, 2004).

## 2.2 Logam Besi (Fe)

Berdasarkan sudut pandang toksikologi, logam berat dapat dibagi dalam dua jenis. Jenis pertama adalah logam berat esensial, dimana keberadaannya dalam jumlah tertentu sangat dibutuhkan oleh organisme hidup, namun dalam jumlah yang berlebihan dapat menimbulkan efek racun. Contoh logam berat ini adalah Zn, Cu, Fe, Co, Mn, Ni, dan sebagainya sedangkan jenis kedua adalah logam berat tidak esensial atau beracun seperti Hg, Cd, Pb, Cr, dan lain-lain (Yudo, 2006).

Besi atau Ferrum (Fe) adalah metal berwarna putih keperakan, liat, dan dapat dibentuk. Di alam didapat sebagai hematit (Yudo, 2006). Besi dioksidasi menjadi Fe (III) dan membentuk mineral yang tidak terlarut seperti hematit, goetit, dan ferihidrit. Sebaliknya, Fe (II) terlarut dalam air namun hanya terdapat pada kondisi anoksik. Konsentrasi Fe (II) dapat direduksi oleh keberadaan fosfat dan karbonat. Potensial reduksi dari Fe (III) menjadi Fe (II) adalah  $E^{\circ} = 0,77 \text{ V}$ . Oleh karena itu besi dalam keadaan toksik berbentuk  $\text{Fe}^{3+}$ . Namun potensial reduksinya mudah terpengaruh oleh agen pengkelat. Hal ini menyebabkan protein yang mengandung besi dapat mengontrol suatu reaksi dan mengkatalisis reaksi redoks (Wittenwiller, 2007).

Besi sangat penting sebagai komponen pigmen sitokrom pada respirasi seluler (Madigan *et al.*, 2012; Prescott *et al.*, 2008; Talaro & Talaro, 2002) dan sebagai kofaktor enzim (Prescott *et al.*, 2008). Dalam respirasi seluler pada organisme aerobik,

elektron yang dilepaskan dari substrat ditransfer ke molekul oksigen melalui perjalanan elektron dari sitokrom, enzim flavin, protein besi nonheme, dan lain-lain. Energi dilepaskan saat elektron berjalan dan energi tersebut dapat dimanfaatkan untuk kebutuhan organisme (Neilands, 1974). Menurut Pergub Bali No. 8 Tahun 2007 baku mutu logam Fe yaitu 5 mg/L (ppm).

### 2.3 Resistensi

Bakteri telah mengembangkan beberapa sistem yang efisien untuk detoksifikasi logam. Mekanismenya dapat digolongkan ke dalam 5 kategori, yaitu (1) penyerapan intraseluler; (2) mengekspor; (3) mereduksi permeabilitas; (4) penyerapan ekstraseluler; dan (5) detoksifikasi ekstraseluler (Rough *et al.* dalam Sherameti & Varma, 2010). Hampir semua mekanisme resistensi bakteri dikode pada plasmid dan transposon (Silver & Walderhaug dalam Sherameti & Varma, 2010) dan hal itu memungkinkan transfer gen atau mutasi spontan yang menyebabkan bakteri resisten terhadap logam. Resistensi bakteri terhadap logam dapat melalui mekanisme biosorpsi dan bioakumulasi. Mekanisme biosorpsi merupakan proses pasif sehingga logam tidak meracuni bakteri. Sedangkan mekanisme bioakumulasi merupakan proses aktif dimana logam berat dapat meracuni sel bakteri (Chojnacka, 2010).

### 2.4 Siderofor

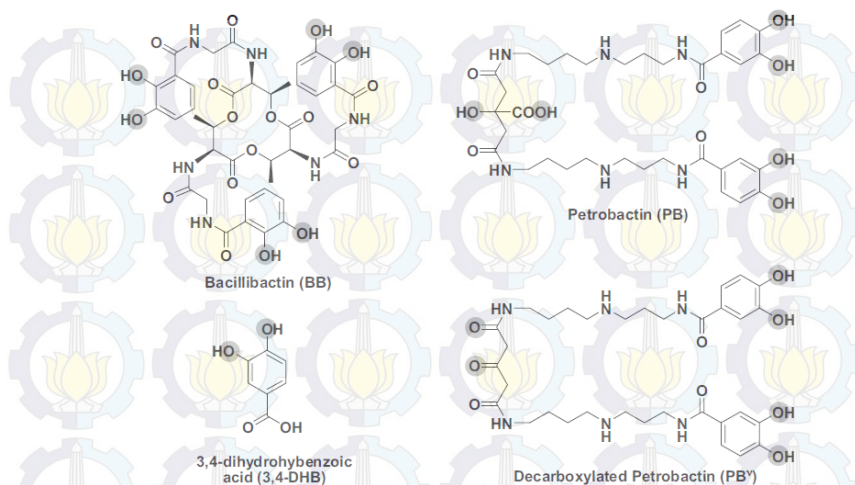
Penyerapan besi dari lingkungan biasanya sulit bagi mikroorganisme karena bentuknya yang tidak larut (*insoluble*) seperti Ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Prescott *et al.*, 2008). Pada keadaan pH yang mendekati netral, besi seringkali berbentuk ferric hidroksida (Plowman *et al.*, 1984). Beberapa bakteri dan jamur menghadapi kesulitan tersebut dengan mensekresikan siderofor (Prescott *et al.*, 2008). Terdapat hampir 500 jenis siderofor yang diketahui dan diproduksi oleh bakteri, jamur, dan tumbuhan (Boukhalfa &



Crumbliss dalam Wittenwiller, 2007). Siderofor merupakan senyawa organik dengan berat molekul ringan yang mampu membentuk kompleks dengan Ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dan menyalurkannya ke dalam sel (Prescott *et al.*, 2008) dan diubah menjadi bentuk  $\text{Fe}^{2+}$  (Grossman *et al.*, 1993). Pada bakteri patogen, siderofor disintesis untuk mendapatkan besi dari inangnya (Lee *et al.*, 2007).

Sebagian besar siderofor secara kimia dikategorikan sebagai katekolat, hidroksamat, atau  $\alpha$ -hidroksikarboksilat berdasarkan gugus fungsinya yang membentuk ligan dengan ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Beberapa molekul tersebut adalah polipeptida yang disintesis dari NRPS (*Nonribosomal Peptide Synthetases*), yaitu suatu enzim yang multifungsi yang juga bertanggung jawab dalam biosintesis peptida antibiotik pada mikroba (Lee *et al.*, 2007).

Pada bakteri Gram positif, termasuk spesies *Bacillus*, siderofor berikatan dengan protein membran spesifik (*specific membrane-anchored substrate-binding proteins* / SBPs). Siderofor kemudian ditransportasikan melalui membran sitoplasma ke komponen permease dari transporter ABC-type dengan bantuan ATP. Untuk beradaptasi pada kondisi lingkungan yang bervariasi, mikroorganisme biasanya memproduksi lebih dari satu macam siderofor (Zawadzka *et al.*, 2009). Anggota *Bacillus cereus* diketahui memproduksi dua macam siderofor, *bacillibactin* dan *petrobactin* (Gambar 2.2). Keduanya berikatan dengan unit dihidroksibenzoat (DHB), sebagian pada *petrobactin* dan secara keseluruhan pada *bacillibactin*. Biosintesis dari *bacillibactin* sendiri diatur oleh regulasi operon *Fur* (Hotta *et al.*, 2010).



Gambar 2.2 Struktur Molekul Siderofor yang Diproduksi oleh Spesies *Bacillus* (Zawadzka *et. al.*, 2009).

Keefisienan dari siderofor dapat ditentukan dari struktur kimia dan dari jenis lingkungan tempat dihasilkannya. Siderofor yang memiliki struktur kimia siklik lebih stabil daripada yang memiliki struktur linier (Wittenwiler, 2007).

## 2.5 Bioremoval

Mekanisme toleransi mikroba terhadap logam berat dengan cara kompleksasi meliputi produksi polisakarida ekstraselular yang memiliki sifat-sifat anion yang berfungsi sebagai bioakumulator yang efisien, produksi metabolit organik yang memiliki sifat pengkelat dan membentuk kompleks dengan logam, presipitasi, serta kristalisasi ekstraselular (Gadd dalam Saraswati & Yuniarti, 2007). *Bioremoval* merupakan penggunaan sistem biologi untuk mengangkat atau menghilangkan polutan (Wilde & Benemann, 1993). *Removal* (pengangkatan) logam pada sistem biologi dan tipe mekanismenya bergantung pada spesies



dimana logam berat itu ada. Proses *bioremoval* dipengaruhi oleh pH, ion lain, suhu, spesies mikroba, potensial redoks, dan faktor lainnya (Noyes, 1994).

Mikroba yang toleran logam berat dengan mekanisme selain *efflux* disebut sebagai mikroba pengakumulasi logam berat (Gadd & White ; Dave *dalam* Saraswati & Yuniarti, 2007). Menurut Iyer *et al* (2005), mekanisme biosorpsi berhubungan dengan adanya eksopolisakarida (EPS) pada dinding sel bakteri yang berfungsi sebagai pengkelat logam berat di permukaan sel. Molekul kompleks pada dinding sel bakteri terdiri dari peptidoglikan yang tersusun oleh molekul-molekul yang lebih sederhana antara lain fosforil, karboksil, dan asam amino yang mempunyai muatan negatif, muatan negatif akan berinteraksi dengan ion atau molekul yang bermuatan positif di lingkungan luarnya sehingga berbentuk ikatan ligan. Ion logam bermuatan positif, sehingga secara elektrostatis akan terikat pada permukaan sel (Langley & Baveridge *dalam* Sholikhah & Kuswitasari, 2012). Bakteri, kapang, ganggang, dan ragi mampu mengakumulasi logam berat Ag, Au, Cd, Co, Cu, Fe, Ni, U, dan Zn (Gadd & White; Dave *dalam* Saraswati & Yuniarti, 2007). Di dalam tanah, sel-sel mikroba baik mati maupun hidup dan produknya dapat merupakan bioakumulator logam berat yang sangat efisien (Saraswati & Yuniarti, 2007).

## **BAB III METODOLOGI**

### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Februari 2015 – Mei 2015 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA-ITS dan Laboratorium Mikrobiologi Pusat Penelitian Biologi LIPI Cibinong.

### **3.2 Metode Penelitian**

#### **3.2.1 Bakteri yang Digunakan**

Isolat bakteri yang digunakan adalah genus *Bacillus* A6, S1, S6, SS19, DA11 endogenik Kalimas Surabaya, dan *Bacillus cereus* ATCC 1178 yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA ITS.

#### **3.2.2 Uji Rekonfirmasi *Bacillus***

Uji rekonfirmasi diawali dengan purifikasi *Bacillus* uji pada medium *nutrient agar* (Lampiran 1) dengan metode gores (*streak*) untuk mendapatkan satu koloni murni dan mengetahui morfologi koloni *Bacillus*. Setelah didapatkan satu koloni murni, dilakukan subkultur.

Subkultur dilakukan untuk memperpanjang waktu hidup suatu kultur bakteri dengan memindahkannya pada medium yang baru. Sebanyak satu ose isolat diinokulasikan secara aseptis dengan metode *streak* ke dalam tabung reaksi berisi medium *nutrient agar* miring dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Keberhasilan subkultur ditandai dengan tumbuhnya koloni pada medium *nutrient agar* miring.

*Profile matching* karakter kunci *Bacillus* dilakukan dengan pengamatan bentuk sel, pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, dan uji katalase (Lampiran 3).

### **3.2.3 Penapisan Bakteri Siderofor** **Pembuatan Medium Fe-CAS Agar**

Medium Fe-CAS agar (Crome Azurol S / CAS =  $C_{23}H_{13}C_{12}O_9Sn_3$ ) merupakan medium yang digunakan untuk penapisan bakteri siderofor. Semua peralatan gelas yang akan digunakan, dicuci dengan larutan 3M HCl atau yang lebih pekat untuk menghilangkan sisa-sisa logam Fe yang mungkin masih melekat pada peralatan gelas, kemudian dibilas dengan akuades. Medium Fe-CAS agar terdiri dari beberapa larutan (Lampiran 2) yang disterilkan secara terpisah dengan autoklaf selama 15 menit (Husen, 2007; Schwyn & Neilands, 1987).

### **Uji Bakteri Siderofor**

Satu ose isolat *Bacillus* secara aseptis diinokulasikan ke medium Fe-CAS agar dengan metode *streak plate*, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Bakteri sebagai penghasil siderofor adalah koloni yang berwarna kuning sampai oranye yang kontras dengan warna biru media Fe-CAS agar (Husen, 2007). Selanjutnya yang digunakan untuk uji *bioremoval* logam adalah isolat yang positif sebagai bakteri siderofor; jika semua isolat positif siderofor dilakukan penapisan isolat dengan cara uji resistensi terhadap logam Fe.

### **3.2.4 Uji Resistensi dan *Range Finding Test* Isolat Terhadap $FeCl_3 \cdot 6H_2O$**

Satu ose isolat *Bacillus* dari medium padat *nutrient agar* (hasil subkultur) diinokulasikan secara aseptis dengan metode *streak* pada medium *nutrient agar* dengan kandungan  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  0,1 mg/L (Lampiran 1), diinkubasi 24 jam pada suhu ruang. Isolat yang tumbuh adalah isolat yang resisten  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ .

*Range finding test* digunakan untuk mendapatkan isolat yang mampu mentoleransi konsentrasi optimum logam Fe. Isolat ditumbuhkan secara aseptis pada medium *nutrient agar* yang mengandung  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  dengan konsentrasi 5, 8, 25, 50 mg/L



dan seterusnya (interval 25) sampai didapatkan konsentrasi yang mampu ditoleransi isolat uji. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu ruang. Hasil *range finding test* yang digunakan adalah konsentrasi  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  di bawah konsentrasi maksimal yang mampu ditoleransi isolat uji. Isolat yang akan digunakan untuk uji *bioremoval* adalah 3 isolat yang memiliki toleransi lebih tinggi terhadap  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dibandingkan isolat lainnya. Selanjutnya isolat dan konsentrasi  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dari *range finding test* akan digunakan untuk uji *bioremoval* Fe. Misal  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$ , dan seterusnya (mewakili konsentrasi) dan  $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$ , dan seterusnya mewakili isolat.

### 3.2.5 Uji Viabilitas Isolat Terhadap Cekaman Logam Fe

Uji viabilitas isolat terhadap cekaman logam Fe dilakukan untuk mengetahui daya hidup isolat *Bacillus* uji dalam medium *nutrient broth* yang mengandung Fe. Uji ini dilakukan dengan pembuatan kurva pertumbuhan dalam medium *nutrient broth* yang mengandung  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  pada isolat uji yang sudah terpilih di *range finding test*. Konsentrasi  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  yang digunakan adalah  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$ , dan tanpa logam Fe untuk kontrol.

Sebelum pembuatan kurva, pembuatan kultur starter dilakukan terlebih dahulu. Pembuatan kultur starter dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama untuk kultur starter I. Satu ose isolat *Bacillus* hasil subkultur diinokulasikan secara aseptis ke dalam 10 ml medium *nutrient broth* (Lampiran 1) dalam Erlenmeyer, diinkubasi selama 18 jam pada suhu ruang di atas *rotary shaker* (100 rpm). Selanjutnya tahap kedua untuk kultur starter II. Setelah diinkubasi 18 jam, 5 ml kultur starter I diinokulasikan secara aseptis ke dalam 45 ml medium *nutrient broth* dalam Erlenmeyer dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu ruang di atas *rotary shaker* (100 rpm).

Sebanyak 10 ml kultur starter II diinokulasikan secara aseptis ke dalam Erlenmeyer berisi 90 ml medium *nutrient broth*

dengan penambahan  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  sesuai konsentrasi yang dibutuhkan. Untuk kontrol tidak ditambahkan  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Setiap jam/2 jam sebanyak 1,5 ml kultur diambil dan dimasukkan ke dalam kuvet kemudian diukur nilai *Optical Density* (OD) nya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 600 nm (Harley & Prescott, 2002). Pengukuran OD dimulai dari jam ke-0 sampai jam ke 24. Data OD yang didapatkan kemudian dibuat kurva pertumbuhan dengan sumbu x sebagai waktu (t) dan sumbu y sebagai nilai OD.

### 3.2.6 Penentuan Umur Isolat Untuk Uji *Bioremoval* Fe

Penentuan umur isolat untuk uji *bioremoval* Fe dilakukan dengan pembuatan kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan dilakukan untuk mengetahui gambaran tahap-tahap pertumbuhan bakteri (Madigan *et al.*, 2012).

Sebelum pembuatan kurva, pembuatan kultur starter dilakukan terlebih dahulu. Pembuatan kultur starter dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama untuk kultur starter I. Satu ose isolat *Bacillus* hasil subkultur diinokulasikan secara aseptis ke dalam 10 ml medium *nutrient broth* (Lampiran 1) dalam Erlenmeyer, diinkubasi selama 18 jam pada suhu ruang di atas *rotary shaker* (100 rpm). Selanjutnya tahap kedua untuk kultur starter II. Setelah diinkubasi 18 jam, 5 ml kultur starter I diinokulasikan secara aseptis ke dalam 45 ml medium *nutrient broth* dalam Erlenmeyer dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu ruang di atas *rotary shaker* (100 rpm).

Sebanyak 10 ml kultur starter II diinokulasikan secara aseptis ke dalam Erlenmeyer berisi 90 ml medium *nutrient broth*. Setiap jam/2 jam sebanyak 1,5 ml kultur diambil dan dimasukkan ke dalam kuvet kemudian diukur nilai *Optical Density* (OD) nya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 600 nm (Harley & Prescott, 2002). Pengukuran OD dimulai dari jam ke-0 sampai jam ke 24. Data OD yang didapatkan kemudian dibuat



kurva pertumbuhan dengan sumbu x sebagai waktu (t) dan sumbu y sebagai nilai OD.

Umur kultur ( $\mu$ ) untuk perlakuan *bioremoval* logam Fe berpedoman pada kurva pertumbuhan kultur tanpa pemaparan Fe. Umur kultur ( $\mu$ ) dihitung dengan formula:

$$\mu = \frac{a-b}{2}$$

$\mu$  = Umur kultur untuk perlakuan *bioremoval* logam Fe

a = waktu (t) fase log akhir

b = waktu (t) fase log awal

### **3.2.7 Uji Bioremoval Fe** **Pembuatan Larutan Stok Logam**

Larutan stok logam  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  untuk uji *bioremoval* dibuat dengan konsentrasi 5000 mg/L. Sebanyak 500 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dalam 100 ml akuades dalam Erlenmeyer.

### **Kultur Starter Uji Bioremoval Fe**

Pembuatan kultur starter dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama untuk Starter I. Satu ose isolat uji diinokulasikan secara aseptis ke dalam 20 ml medium cair *nutrient broth* dan diinkubasi selama 20 jam pada suhu ruang di atas *rotary shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Untuk starter II, starter I yang berumur 20 jam diinokulasikan secara aseptis ke 80 ml medium *nutrient broth* dan diinkubasi selama 20 jam pada suhu ruang di atas *rotary shaker* dengan kecepatan 100 rpm.

### **Pengukuran Konsentrasi $\text{FeCl}_3$ yang Diremoval Isolat Uji**

Kultur *Bacillus* uji (dari starter) sebanyak 45 ml diinokulasikan secara aseptis ke dalam 180 ml medium cair *nutrient broth*, diinkubasi sampai dengan  $\mu$  jam sesuai kurva

pertumbuhan. Kultur uji sebelum dipapar  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dihitung kepadatannya dengan *Haemocytometer*, selanjutnya diambil 50 ml dan dipapar dengan  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dengan konsentrasi sesuai dengan *range finding test* ( $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$ ). Setelah inkubasi selama 24 jam di atas *rotary shaker* (100 rpm), larutan kultur ditambahkan 5 tetes  $\text{HNO}_3$  serta dipanaskan pada suhu  $\leq 85^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Setelah itu larutan kultur disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan filtrat dan pelet sel *Bacillus*. Pengukuran konsentrasi  $\text{Fe}^{3+}$  di filtrat dilakukan dengan menggunakan AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometry*) dengan panjang gelombang ( $\lambda$ ) 248,3 nm (Fathurrahmi, 2012). Konsentrasi  $\text{Fe}^{3+}$  pada filtrat medium merupakan konsentrasi logam  $\text{Fe}^{3+}$  sisa ( $K_s$ ) yang tidak di-removal oleh *Bacillus*. Konsentrasi yang mampu di-removal oleh *Bacillus* dan efisien removalnya dihitung dengan formula:

$$R = K_0 - K_s$$

$$E = \frac{R}{K_0} \times 100 \%$$

R = Konsentrasi  $\text{Fe}^{3+}$  yang di-removal *Bacillus*

E = Efisiensi *Bioremoval* Fe

$K_0$  = Konsentrasi awal  $\text{Fe}^{3+}$  dalam medium tanpa inokulum *Bacillus*

$K_s$  = Konsentrasi akhir  $\text{Fe}^{3+}$  pada filtrat setelah isolat difiltrasi

### 3.2.8 Viabilitas *Bacillus*

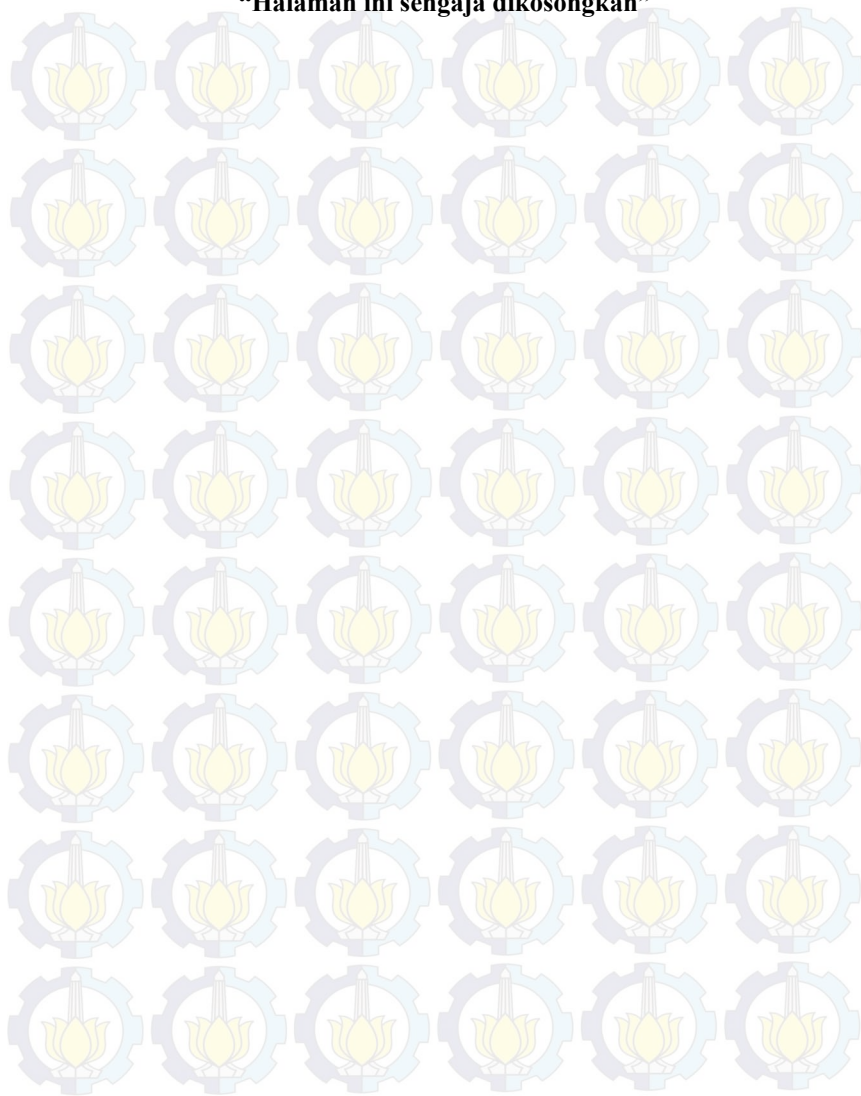
Isolat *Bacillus* yang telah terpapar  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  diambil sebanyak 100  $\mu\text{L}$  dan diinokulasikan pada medium *nutrient agar* dengan menggunakan metode *pour plate*. Koloni yang tumbuh adalah koloni yang memiliki viabilitas terhadap paparan  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Jika koloni tumbuh lebih dari 300 CFU (*Colony Forming Units*) maka dilakukan pengenceran. CFU yang dapat diterima adalah 30 – 300 (Ingham & Schneeberger, 2012).

### 3.3 Rancangan Penelitian dan Analisa Data

Penelitian dilakukan dengan metode kualitatif untuk uji siderofor dan uji resisten serta dengan metode kuantitatif untuk uji *bioremoval* Fe dan uji viabilitas (CFU).

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perbedaan perlakuan diuji dengan *Multivariate Analysis of Varians* (MANOVA) dengan taraf kepercayaan ( $p = 5\%$ ), uji beda nyata dilakukan dengan uji beda nyata terkecil (BNT). Pengulangan dilakukan dua kali.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**





## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil Rekonfirmasi *Bacillus*

Uji rekonfirmasi *Bacillus* dilakukan untuk menentukan bahwa isolat uji adalah dari genus *Bacillus*. Isolat yang digunakan adalah A6, DA11, S1, S6, SS19 yang diisolasi dari Kalimas Surabaya (Zulaika *et al.*, 2012) dan *Bacillus cereus* ATCC 1178 sebagai isolat pembanding.

Secara umum koloni isolat *Bacillus* berbentuk irregular dengan tepi berombak (tidak rata) dan berwarna putih keruh (Lampiran 5). Hasil *profile matching* karakter kunci *Bacillus* menunjukkan bahwa isolat *Bacillus* uji berbentuk batang, merupakan bakteri Gram positif, membentuk endospora, motil, bersifat aerob atau anaerob fakultatif, kemoorganotrof, dan katalase positif (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Hasil Uji Rekonfirmasi *Bacillus* spp.

Karakter Kunci <i>Bacillus</i> *	Kode Isolat					
	A6	DA11	S1	S6	SS19	<i>B. cereus</i>
Berbentuk batang	+	+	+	+	+	+
Gram positif	+	+	+	+	+	+
Endospora	+	+	+	+	+	+
Motil	+	+	+	+	+	+
Aerob/Fakultatif	+	+	+	+	+	+
Anaerob	+	+	+	+	+	+
Kemoorganotrof	+	+	+	+	+	+
Katalase Positif	+	+	+	+	+	+

\*Holt *et al.* (1994)

Morfologi koloni *Bacillus* yang secara umum berbentuk irregular, berwarna putih keruh, dan tepi berombak sesuai dengan pernyataan Holt *et al.* (1994) yang menyatakan bahwa genus *Bacillus* menunjukkan koloni yang berbeda-beda pada medium



*nutrient agar*. Warna koloni pada umumnya putih sampai kekuningan atau putih suram, tepi koloni bermacam-macam namun pada umumnya tidak rata, permukaannya kasar, koloni besar, dan tidak mengkilat. Bentuk koloni dan ukurannya sangat bervariasi tergantung dari jenisnya.

Semua *Bacillus* uji berbentuk batang dan merupakan bakteri Gram positif. Bakteri Gram positif berwarna ungu (Harisha, 2006) setelah pewarnaan Gram dengan *crystal violet* dan safranin. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel 60-90% terdiri dari peptidoglikan (Harisha, 2006). Pada pewarnaan endospora menggunakan *malachite green*, semua isolat uji membentuk endospora (bagian berwarna hijau pada sel bakteri). Endospora merupakan suatu struktur khusus yang mengandung *dipicolinic acid* (DPA) sebagai penanda resistensi bakteri tersebut terhadap paparan panas, radiasi ultraviolet, juga radiasi gamma. Endospora dapat berbentuk bulat, oval, elips, atau silinder, yang terbentuk di dalam sel vegetatif (Prescott *et al.*, 2008).

Semua isolat *Bacillus* uji bersifat motil. Secara umum genus *Bacillus* memiliki *peritrichous flagella* (Berber, 2004) yang menyebabkan *Bacillus* bersifat motil (Schaechter *et al.*, 2006). Genus *Bacillus* bersifat aerob dan atau fakultatif anaerob, tersebar pada beberapa habitat, seperti tanah, air, hingga makanan, namun paling banyak ditemukan di tanah (Hatmanti, 2000). *Bacillus* merupakan mikroorganisme kemoorganotrof, yaitu organisme yang mendapatkan sumber energi dari bahan organik (Madigan *et. al.*, 2012). Selain itu *Bacillus* juga memiliki enzim katalase yang ditandai dengan munculnya gelembung saat berinteraksi dengan  $H_2O_2$  (Harley & Prescott, 2002).

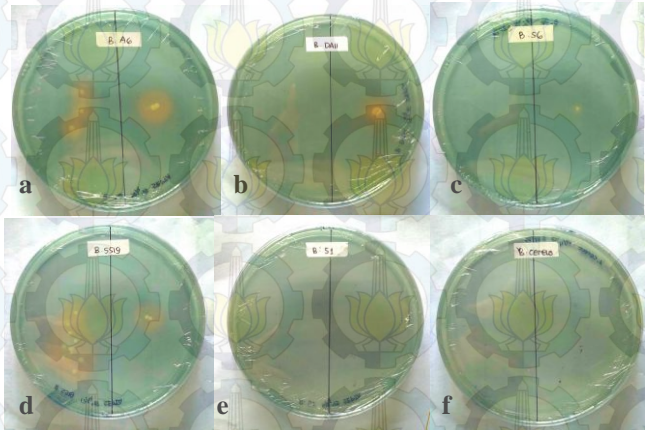
Berdasarkan hasil *profil matching* sesuai karakter kunci dengan panduan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, semua isolat *Bacillus* uji benar-benar dari genus *Bacillus*. Berdasarkan Holt *et al.*, (1994), genus *Bacillus* mempunyai ciri spesifik yaitu berbentuk batang, merupakan

bakteri Gram positif, membentuk endospora, motil, bersifat aerob dan atau anaerob fakultatif, kemoorganotrof, dan katalase positif.

#### 4.2 Penapisan Bakteri Siderofor

Penapisan bakteri siderofor dilakukan untuk menyeleksi isolat *Bacillus* uji yang mampu menghasilkan siderofor. Penapisan ini dilakukan dengan medium Fe-CAS, yaitu medium yang digunakan secara universal untuk mendeteksi siderofor (Schwyn & Neilands, 1987; Bholay *et al.*, 2012).

Berdasarkan hasil yang didapat, *Bacillus* uji yang menghasilkan siderofor adalah *Bacillus* A6, DA11, S6, SS19. Koloninya membentuk warna kuning sampai oranye pada medium Fe-CAS Agar (Gambar 4.1 dan Tabel 4.2).



Gambar 4.1 Hasil Uji Siderofor Setelah Inkubasi 48 Jam

Keterangan gambar : (a: *Bacillus* A6, b: *Bacillus* DA11, c: *Bacillus* S6, d: *Bacillus* SS19, e: *Bacillus* S1, dan *Bacillus cereus* ATCC 1178).

Tabel 4.2 Hasil Penapisan Bakteri Siderofor

No.	Isolat <i>Bacillus</i>	Warna kuning- oranye	Ukuran Zona Siderofor	
			Inkubasi 24 Jam	Inkubasi 48 Jam
1.	A6	+	0,6 cm	1,225 cm
2.	<i>B. cereus</i>	-	-	-
3.	DA11	+	0,4 cm	0,55 cm
4.	S1	-	-	-
5.	S6	+	0,2 cm	0,25 cm
6.	SS19	+	0,4 cm	0,975 cm

Keterangan : (+): Koloni tumbuh membentuk warna kuning-oranye, (-): Koloni tidak tumbuh dan tidak membentuk warna kuning-oranye.

Terbentuknya warna kuning pada medium Fe-CAS Agar disebabkan adanya siderofor yang diproduksi oleh isolat uji. Menurut Louden *et al.* (2011) CAS (Chrome Azurol S) dan HDTMA membentuk kompleks yang kuat dengan ferric yang menyebabkan warna biru pada medium Fe-CAS agar. Menurut Schwyn & Neilands (1987) apabila terdapat pengkelat logam besi (Fe) yang kuat seperti siderofor, maka pengkelat tersebut akan mengambil Fe dari kompleks pewarna *Blue Dye* sehingga medium Fe-CAS Agar yang berwarna biru akan berubah warna menjadi oranye.



Fe : Ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ )

Dye : *Blue Dye*

L : Ligan (Siderofor)

(Schwyn & Neilands, 1987)

Genus *Bacillus* adalah Gram positif, senyawa siderofor akan berikatan dengan protein membran spesifik (*specific membrane - anchored substrate-binding-proteins/SBPs*). Senyawa siderofor kemudian ditransportasikan melalui membran sitoplasma ke



komponen permease dari transporter tipe ABC dengan bantuan ATP (Zawadzka *et al.*, 2009). Beberapa anggota *Bacillus* diketahui memproduksi dua macam siderofor, *bacillibactin* dan *petrobactin*. Biosintesis dari *bacillibactin* diatur oleh regulasi operon *Fur* (Hotta *et al.*, 2010). Namun dalam penelitian ini belum diketahui jenis siderofor yang diproduksi karena tidak dilakukan uji bahan aktif siderofor. Siderofor merupakan agen pengkelat  $\text{Fe}^{3+}$  yang diproduksi bakteri dalam keadaan cekaman kekurangan Fe (Verma *et al.*, 2012). Komposisi medium Fe-CAS sebagai media uji siderofor, memiliki kandungan logam Fe hanya 0,0027 gr/L, supaya bakteri yang diuji mampu memproduksi siderofor. Hal tersebut juga didukung oleh pernyataan Harvie *et al.* (2005) dan Bhagwat *et al.* (2013) bahwa *Bacillus* tidak memproduksi siderofor dalam kondisi lingkungan yang kaya akan Fe.

Siderofor yang diproduksi bakteri telah digunakan secara efisien sebagai agen biokontrol untuk melawan patogen pada tanah yang ditanami tumbuhan. Siderofor secara signifikan akan mengurangi keberadaan ion ferric yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan fungi patogen. Siderofor berguna dalam agrikultur untuk manajemen penyakit tumbuhan dan juga peningkatan pertumbuhan tumbuhan (Patil *et al.*, 2014).

*Bacillus* S1 dan *Bacillus cereus* ATCC 1178 tidak menghasilkan siderofor setelah ditumbuhkan pada medium Fe-CAS Agar (Gambar 4.2). Namun beberapa peneliti menyatakan bahwa *Bacillus cereus* memproduksi dua macam siderofor, *bacillibactin* dan *petrobactin* (Hotta *et al.*, 2010). Tidak tumbuhnya kedua isolat tersebut pada medium Fe-CAS dapat disebabkan karena adanya kandungan bahan medium yang bersifat toksik bagi beberapa bakteri. Verma *et al.*, (2012) menyatakan bahwa HDTMA (*Hexadecyltrimethylammonium bromide*) bersifat toksik bagi beberapa bakteri dan menyebabkan tidak tumbuhnya bakteri pada medium Fe-CAS. HDTMA merupakan surfaktan dan dapat bersifat sebagai antibakterial yang

menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel serta keluarnya ion interseluler dan massa metabolit sel ke luar sel (Parolo *et al.*, 2011). Selain itu bakteri Gram positif lebih peka terhadap reagen yang bersifat toksik daripada bakteri Gram negatif (Verma *et al.*, 2012). Berdasarkan fakta di atas, isolat *Bacillus* uji yang bersifat sebagai bakteri siderofor adalah *Bacillus* A6, DA11, S6, dan SS19.

Berdasarkan ukuran zona siderofor pada tabel 4.2, isolat *Bacillus* yang membentuk ukuran zona siderofor paling besar adalah *Bacillus* A6 dan yang paling kecil adalah *Bacillus* S6. Hal tersebut bergantung pada kemampuan masing-masing isolat dalam memproduksi siderofor untuk pengambilan Fe. Hu & Xu (2011) menyatakan dalam deteksi siderofor, faktor yang penting adalah substrat atau mediumnya. Hasil uji siderofor menunjukkan zona siderofor terbesar sampai terkecil secara berturut-turut adalah *Bacillus* A6, SS19, DA11, dan S6.

#### 4.3 Uji Resistensi *Bacillus* Terhadap Logam Besi (Fe)

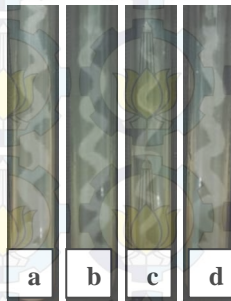
Uji resistensi dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat tumbuh dalam medium yang mengandung logam Fe. Isolat yang digunakan untuk uji resistensi adalah isolat yang mampu menghasilkan siderofor, yaitu *Bacillus* A6, DA11, S6, dan SS19. Hasil yang didapat, semua isolat *Bacillus* mampu tumbuh pada media *nutrient agar* yang mengandung logam Fe sampai dengan 300 mg/L. Berdasarkan pengukuran AAS, konsentrasi Fe pada media mengalami penurunan cukup besar sekitar  $\geq 70\%$  (Tabel 4.5) yang menyebabkan konsentrasi Fe di media rendah (Tabel 4.3 dan Gambar 4.2). Sesuai dengan Baby *et al.*, (2014), *Bacillus* mampu tumbuh dengan baik pada medium yang mengandung Fe (III) dalam konsentrasi rendah.



Tabel 4.3 Hasil Uji Resistensi  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 

Kode Isolat	Konsentrasi (mg/L)											
	0,1	5	8	25	50	75	100	125	150	175	200	300
A6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DA11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S6	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++
SS19	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Keterangan: (+++) = tumbuh baik, (++) = tumbuh sedang, (+) = tumbuh rendah, (-) = tidak tumbuh

Gambar 4.2 Hasil Uji Resistensi *Bacillus* Pada Konsentrasi Fe 300 mg/L

Keterangan gambar : (a: *Bacillus* A6, b: *Bacillus* DA11, c: *Bacillus* S6, dan d: *Bacillus* SS19).

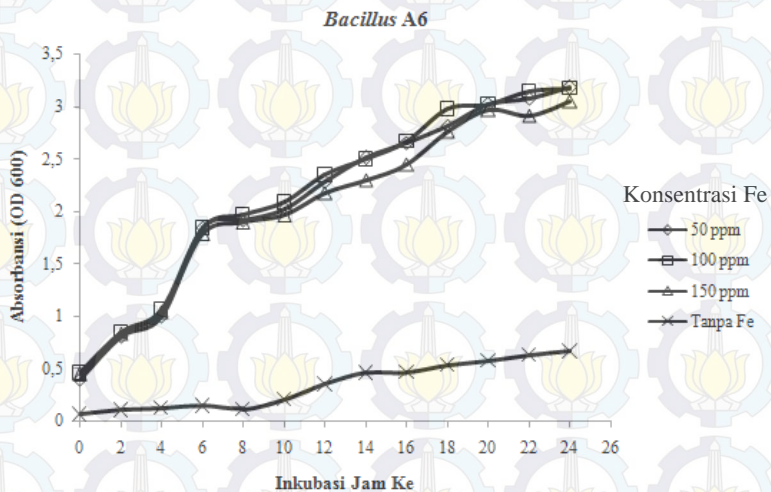
Semua *Bacillus* uji mampu tumbuh dalam medium yang mengandung Fe karena Fe dibutuhkan dalam metabolisme sel bakteri. Hal tersebut juga dinyatakan oleh Baby *et al.* (2013) secara umum semua mikroorganisme, termasuk *Bacillus* membutuhkan Fe untuk aktivitas metabolisme dan juga sebagai komponen struktural utama pada beberapa enzim. Dalam penelitiannya Baby *et al.* (2014) menyatakan bahwa beberapa spesies *Bacillus* resisten terhadap logam Fe sampai dengan 6000 mg/L, walaupun ada beberapa spesies *Bacillus* yang hanya mampu resisten hingga 100 mg/L.

Menurut Chojnacka (2010), bakteri yang diisolasi dari lingkungan yang tercemar logam berat merupakan bakteri yang mempunyai resistensi tinggi terhadap logam berat di sekitarnya. Isolat *Bacillus* yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari sungai Kalimas Surabaya yang diketahui telah tercemar merkuri antara 0,105 hingga 6,38 mg/L (Zulaika *et al.*, 2012) dan resisten terhadap 25 mg/L HgCl<sub>2</sub> (Zulaika *et al.*, 2012), sehingga *Bacillus* yang diuji pada penelitian ini memiliki toleransi yang baik terhadap logam, sebab Hg merupakan logam berat yang paling toksik dibandingkan logam berat lainnya. Mikroba yang hidup pada lingkungan kaya logam cenderung lebih resisten terhadap logam berat daripada yang hidup di lingkungan tidak kaya logam (Kumar *et al.*, 2013). Resistensi tersebut melalui mekanisme adaptasi (Nithya *et al.*, 2011), hal ini karena adanya perbedaan kromosomal, transposon, dan plasmid yang mengatur sistem resistensi pada masing-masing bakteri (Baby *et al.* 2013). Pada dasarnya, populasi mikroorganisme yang resisten terhadap logam melibatkan perubahan kelarutan dari logam tersebut melalui reduksi, akumulasi, dan secara in-situ immobilisasi (Roane, 1999 dalam Baby *et al.*, 2013). Menurut Nithya *et al.* (2011) salah satu mekanisme penting resistensi pada bakteri terhadap logam adalah adanya protein RND (*Resistance, Nodulation, Cell Division*) yang mengatur transportasi logam melalui membran sel. Pada *Bacillus subtilis* pengambilan Fe diatur oleh protein Fur. Dalam kondisi lingkungan yang kaya akan Fe, protein Fur menekan sistem pengambilan Fe (Fuangthong *et al.*, 2002).

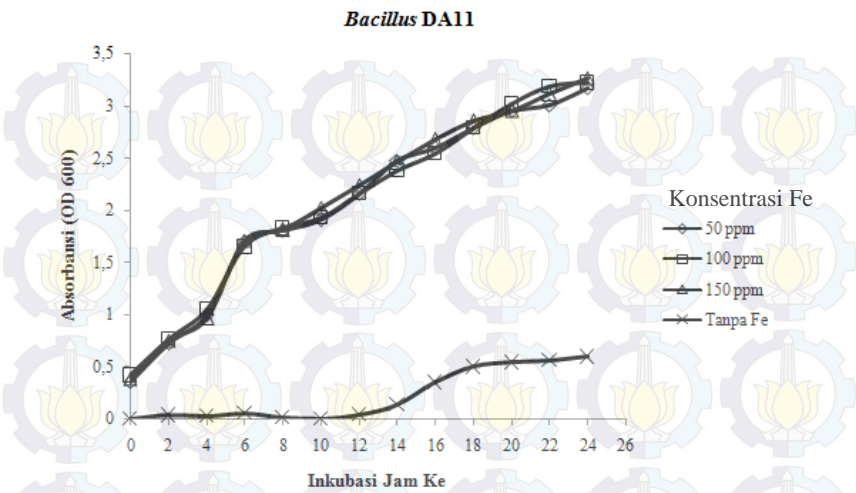
Berdasarkan hasil uji resistensi, keempat isolat *Bacillus* yang diuji menunjukkan pertumbuhan yang baik pada medium *nutrient agar* yang mengandung logam Fe sampai dengan 300 mg/L sehingga *range finding test* untuk *bioremoval* ditentukan konsentrasinya 50, 100, dan 150 mg/L.

#### 4.4 Viabilitas *Bacillus* Pada Medium Tercekam Logam Fe

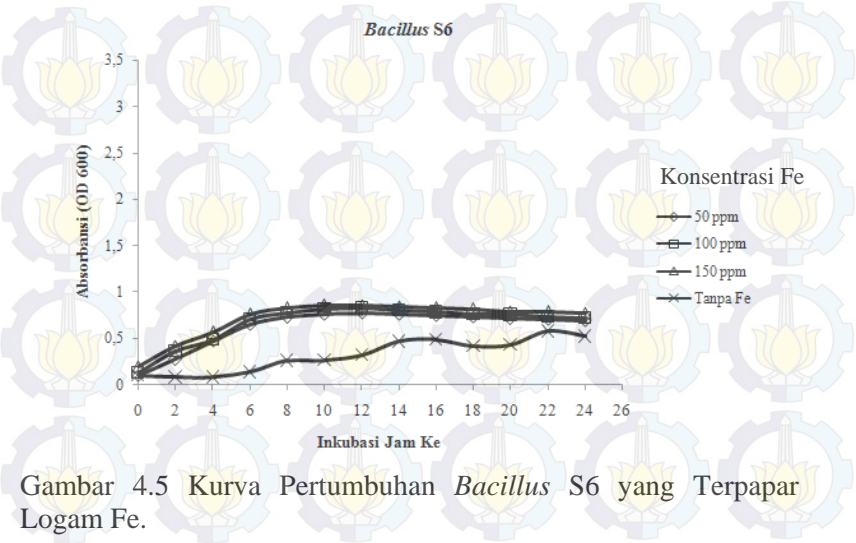
Kurva pertumbuhan isolat *Bacillus* uji dalam medium *nutrient broth* yang tercekam logam Fe digunakan untuk mengetahui kemampuan hidup pada medium yang terpapar logam Fe sesuai konsentrasi berdasarkan *range finding test* yaitu 50, 100, dan 150 mg/L. Kemampuan hidup isolat *Bacillus* divisualisasikan dapat dilihat dari hasil kurva pertumbuhan (Gambar 4.3-4.6).



Gambar 4.3 Kurva Pertumbuhan *Bacillus* A6 yang Terpapar Logam Fe.

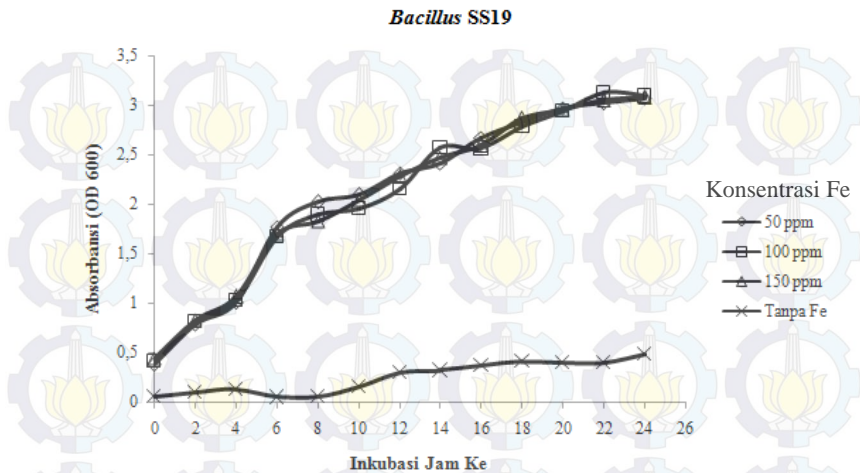


Gambar 4.4 Kurva Pertumbuhan *Bacillus DA11* yang Terpapar Logam Fe.



Gambar 4.5 Kurva Pertumbuhan *Bacillus S6* yang Terpapar Logam Fe.





Gambar 4.6 Kurva Pertumbuhan *Bacillus* SS19 yang Terpapar Logam Fe.

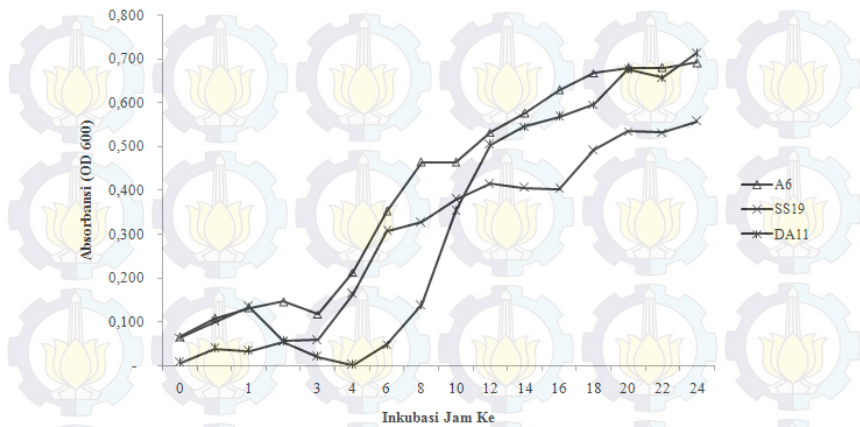
Berdasarkan pola pertumbuhan pada Gambar 4.4 – 4.7, *Bacillus* A6, DA11, dan SS19 menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir serupa, sedangkan *Bacillus* S6 memiliki pola pertumbuhan yang berbeda dengan A6, DA11, dan SS19. Nilai OD paling tinggi berkisar pada nilai 3,25 Å (pengenceran 5x) pada semua konsentrasi logam Fe dan untuk *Bacillus* S6 mempunyai nilai OD 0,85 Å (tanpa pengenceran). Nilai OD tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan nilai OD isolat *Bacillus* uji yang ditumbuhkan pada medium NB tanpa terpapar logam yang berkisar antara 0,5 - 0,6 Å (tanpa pengenceran). Nilai OD semakin tinggi dengan semakin meningkatnya konsentrasi logam. Hal tersebut dapat terjadi karena isolat *Bacillus* resisten pada media *nutrient broth* yang mengandung logam Fe hingga konsentrasi 300 mg/L, sehingga dalam medium tercekam logam Fe, *Bacillus* masih mampu tumbuh dengan baik. Hal tersebut disebabkan logam besi (Fe) penting sebagai komponen pigmen

sitokrom pada respirasi seluler (Madigan *et. al.*, 2012; Prescott *et. al.*, 2008; Talaro & Talaro, 2002) dan sebagai kofaktor enzim (Prescott *et. al.*, 2008) serta adanya protein Fur yang menekan sistem pengambilan Fe berlebih saat kondisi lingkungan bakteri kaya akan Fe (Fuangthong *et al.*, 2002).

Pada kurva pertumbuhan *Bacillus* S6 menunjukkan pertumbuhan yang paling rendah jika dibandingkan dengan ketiga isolat *Bacillus* yang diuji. Hal ini dapat terjadi karena kondisi medium *nutrient broth* yang berupa cairan memungkinkan paparan logam Fe yang lebih besar terhadap sel bakteri yang tersebar bebas di dalam medium daripada di medium padat yang memungkinkan isolat hanya sebagian terpapar logam. Selain itu *Bacillus* S6 di medium *nutrient agar*-Fe pada uji resistensi menunjukkan pertumbuhan yang kurang baik dari konsentrasi 75 mg/L dan seterusnya. Hal tersebut tergantung adaptasi genetik dari masing-masing genus *Bacillus* yang meliputi adaptasi kromosomal, transposon dan plasmid (Baby *et al.* 2013). Berdasarkan hasil kurva pertumbuhan, dipilih tiga isolat *Bacillus* yang memiliki kemampuan viabilitas baik dalam medium terpapar Fe yaitu *Bacillus* A6, DA11, dan SS19 untuk uji *bioremoval* logam Fe.

#### **4.5 Penentuan Umur Isolat Untuk Perlakuan *Bioremoval***

Hasil kurva pertumbuhan *Bacillus* A6, DA11, dan SS19 pada medium *nutrient broth* tanpa logam Fe menunjukkan pola yang secara umum hampir serupa. Fase adaptasi atau fase lag terjadi dari jam ke 0 hingga jam ke 3 pada semua isolat (Gambar 4.7). Fase lag menggambarkan tidak adanya pertumbuhan populasi secara signifikan karena sel mengalami perubahan kimiawi dan bertambah ukuran serta substansi seluler sehingga siap untuk membelah diri (Sulistijowati, 2012).

***Bacillus* spp.**

Gambar 4.7 Kurva Pertumbuhan *Bacillus* A6, DA11, dan SS19 Pada Medium *Nutrient Broth* Tanpa Logam Fe.

Berdasarkan hasil kurva pertumbuhan, umur isolat *Bacillus* untuk perlakuan *bioremoval* ( $\mu$ ) yaitu jam ke 12. Pada jam ke 12 kurva pertumbuhan menunjukkan fase log atau eksponensial. Fase ini menggambarkan terjadinya pertumbuhan dan pembelahan sel bakteri secara maksimal. Pertumbuhan tersebut dipengaruhi oleh kondisi lingkungannya (suhu dan komposisi medium). Pada fase eksponensial, kondisi fisiologis dan kimiawi populasi sel bakteri seragam, sehingga kultur yang berada pada fase eksponensial biasanya digunakan untuk penelitian fisiologis dan biokimia (Madigan *et. al.*, 2012; Prescott *et. al.*, 2008). Secara umum prokariot tumbuh lebih cepat daripada mikroorganisme eukariot. Itu terjadi karena sel yang berukuran kecil memiliki kemampuan untuk meningkatkan kapasitas penyerapan nutrisi daripada sel yang lebih besar, dan hal tersebut dapat mempengaruhi laju pertumbuhannya (Madigan *et. al.*, 2012).



Setelah fase eksponensial terdapat suatu fase dimana jumlah sel bakteri yang tumbuh sama dengan sel bakteri yang mati yang disebut fase stasioner. Fase ini terjadi karena nutrisi dalam medium sudah banyak digunakan sehingga tidak ada pertumbuhan dan produk samping dari metabolisme terakumulasi di medium sehingga menghambat pertumbuhan sel bakteri bahkan dapat menyebabkan kematian (Madigan *et. al.*, 2012). Kurva pertumbuhan pada Gambar 4.8, fase stasioner dimulai jam ke 20 pada semua isolat *Bacillus*. Jika inkubasi dilanjutkan setelah fase stasioner, maka sel-sel bakteri akan mati karena lisis yang disebut fase kematian (Madigan *et. al.*, 2012).

#### 4.6 Uji Bioremoval Fe

Uji *Bioremoval* Fe dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat uji dalam meremoval logam besi (Fe) pada medium *nutrient broth*. Sebelum dipapar logam, kepadatan sel *Bacillus* dihitung menggunakan *Hemocytometer* pada  $\mu$  jam sesuai penentuan umur perlakuan jam ke 12 (Tabel 4.4).

Tabel 4.4 Kepadatan Sel *Bacillus* (Inkubasi 12 jam)

Isolat <i>Bacillus</i>	Jumlah Sel/ml
A6	$67,75 \times 10^6$
DA11	$34,05 \times 10^6$
SS19	$11,55 \times 10^6$

Hasil analisis AAS pada medium *nutrient broth* tanpa isolat menunjukkan penurunan yang relatif besar (Tabel 4.5). Konsentrasi Fe 50 mg/L menjadi 9,496 mg/L; 100 mg/L menjadi 33,365 mg/L; dan 150 mg/L menjadi 33,594 mg/L. Hal tersebut dapat terjadi karena adanya komposisi medium *Nutrient Broth* seperti senyawa-senyawa yang membentuk garam jika terionisasi mampu berikatan dengan logam (Gillespie, 1994). Semua isolat uji mampu melakukan *bioremoval* Fe (Tabel 4.6). Konsentrasi logam besi (Fe) yang lebih besar menunjukkan *bioremoval* yang



lebih besar pula, demikian juga dengan efisiensi *bioremoval* (Tabel 4.6 dan Gambar 4.9). Berdasarkan analisis MANOVA untuk isolat dan efisiensi *bioremoval* Fe, nilai  $p = 0,473$  ( $p > 0,05$ ) yang berarti antara ketiga isolat dan efisiensi *bioremoval* tidak berbeda. Sedangkan analisis MANOVA untuk konsentrasi Fe dan efisiensi *bioremoval*, nilai  $p = 0,001$  ( $p < 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa konsentrasi mempengaruhi efisiensi *bioremoval* dengan perbedaan paling nyata terdapat pada konsentrasi 9,496 dan 33,365 mg/L (Lampiran 6).

Tabel 4.5 Konsentrasi Fe Perlakuan

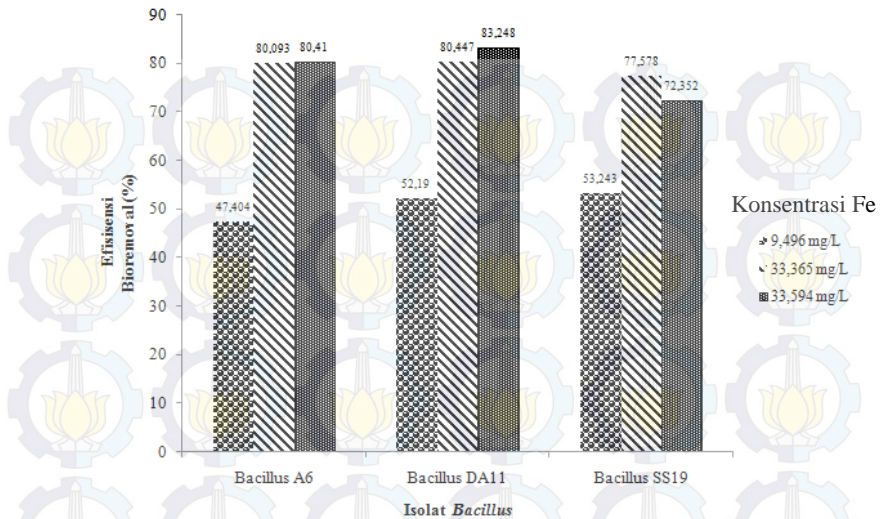
Konsentrasi Perlakuan (mg/L)	Konsentrasi Pengukuran AAS* (mg/L)
50	9,496
100	33,365
150	33,594

\*Balai Riset dan Standardisasi Industri Surabaya

Tabel 4.6 Hasil Uji *Bioremoval* Fe

No.	Isolat <i>Bacillus</i>	Konsentrasi Awal (mg/L)	Konsentrasi Akhir (mg/L)	Konsentrasi <i>Bioremoval</i> (mg/L)*	Efisiensi <i>Bioremoval</i> (%)*
1.	A6	9,496	4,995	<b>4,501<sup>a</sup></b>	<b>47,404<sup>a</sup></b>
		33,365	6,642	26,723 <sup>b</sup>	80,093 <sup>b</sup>
		33,594	6,581	27,013 <sup>b</sup>	80,410 <sup>b</sup>
2.	DA11	9,496	4,54	4,956 <sup>a</sup>	52,190 <sup>a</sup>
		33,365	6,524	26,841 <sup>b</sup>	80,447 <sup>b</sup>
		33,594	5,627	<b>27,967<sup>b</sup></b>	<b>83,248<sup>b</sup></b>
3.	SS19	9,496	4,44	5,056 <sup>a</sup>	53,243 <sup>a</sup>
		33,365	7,481	25,884 <sup>b</sup>	77,578 <sup>b</sup>
		33,594	9,288	24,306 <sup>b</sup>	72,352 <sup>b</sup>

\*Angka yang didampingi huruf yang berbeda pada kolom yang beda signifikan ( $p < 0,05$ ).



Gambar 4.8 Efisiensi *Bioremoval* Fe oleh Isolat *Bacillus*.

*Bioremoval* logam oleh bakteri dapat dipengaruhi oleh temperatur, pH, biomassa, kemampuan toleransi bakteri tersebut terhadap logam (Johncy *et al.*, 2010 dan Silva *et al.*, 2008), dan waktu paparan dengan logam (Shaaban *et al.*, 2015). Terdapat beberapa gugus kimia yang dapat mengikat logam pada mikroba seperti gugus acetamido pada kitin, polisakarida struktural pada fungi, gugus amino dan fosfat pada asam nukleat, gugus sulfhidril dan karboksil pada protein, dan gugus hidroksil pada polisakarida (Shaaban *et al.*, 2015). Gugus-gugus kimia tersebut memiliki muatan negatif yang akan berinteraksi dengan ion atau molekul yang bermuatan positif di lingkungan luarnya sehingga berbentuk ikatan ligan (Wang *et al.*, 2009).

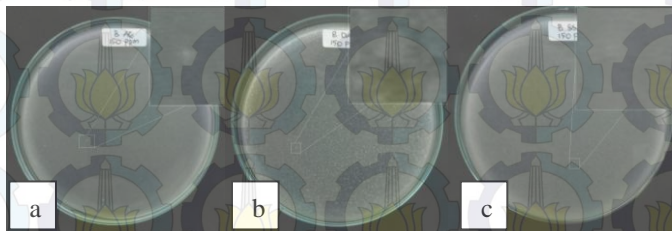
#### 4.7 Uji Viabilitas *Bacillus*

Uji viabilitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan hidup isolat *Bacillus* pada medium *nutrient agar* setelah dipapar logam

Besi (Fe). Isolat *Bacillus* yang telah dipapar Fe pada uji *bioremoval* ditumbuhkan pada medium *nutrient agar* tanpa logam Fe dengan metode *pour plate* dan diinkubasi selama 24 jam. Semua isolat uji tumbuh lebih dari 300 CFU (*Colony Forming Unit*) (Tabel 4.7 dan Gambar 4.9).

Tabel 4.7 Hasil Uji Viabilitas *Bacillus*

Isolat <i>Bacillus</i>	CFU <i>Bacillus</i> Setelah Terpapar Fe		
	9,496 mg/L	33,365 mg/L	33,594 mg/L
A6	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU
DA11	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU
SS19	>300 CFU	>300 CFU	>300 CFU

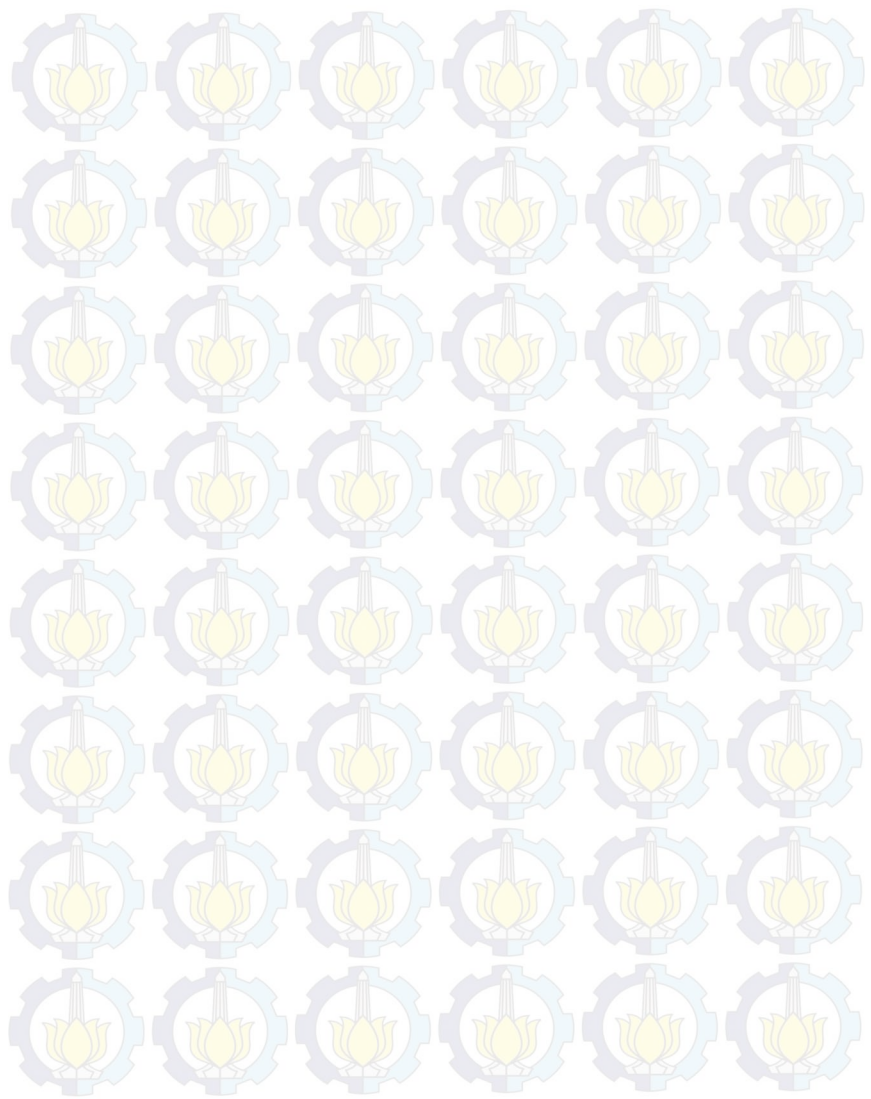


Gambar 4.9 Hasil Uji Viabilitas Isolat *Bacillus*

Keterangan : (a: *Bacillus* A6, b: *Bacillus* DA11, dan c: *Bacillus* SS19).

Hasil uji viabilitas menunjukkan bahwa logam Fe yang dipaparkan dalam medium perlakuan logam tidak mempengaruhi dan menghambat pertumbuhan isolat *Bacillus*. Hal ini terjadi karena Fe merupakan salah satu mikronutrien yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri (Harvie *et al.*, 2005).

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**





## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

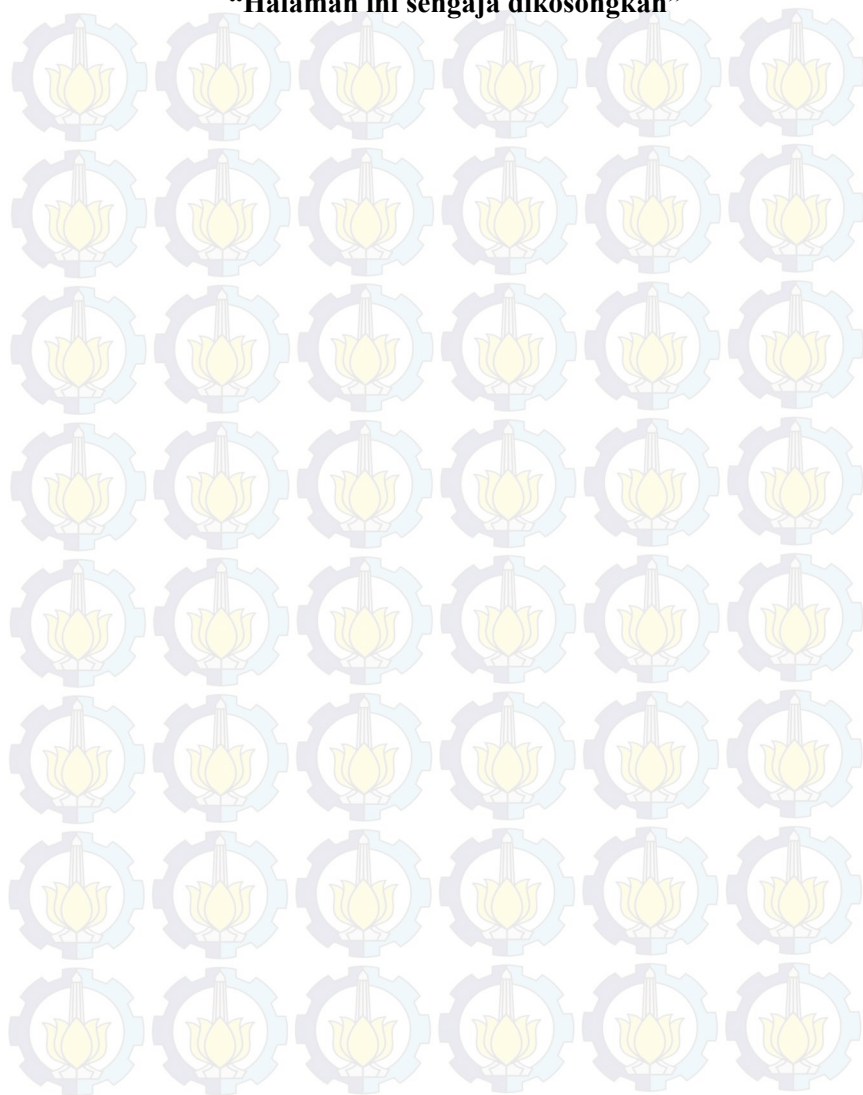
Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Bakteri *Bacillus* A6, DA11, S6, SS19 mampu menghasilkan siderofor dan *Bacillus* S1, *Bacillus cereus* ATCC 1178 tidak menghasilkan siderofor.
2. *Bacillus* A6, DA11, S6, dan SS19 resisten terhadap medium *nutrient agar* yang mengandung logam Fe sampai dengan konsentrasi 300 mg/L.
3. Kemampuan meremoval Fe yang terbaik terdapat pada *Bacillus* DA11 pada perlakuan Fe 33,594 mg/L dengan *bioremoval* 27,967 mg/L dari pemaparan 33,594 mg/L dan efisiensi *bioremoval*nya 83,248%.

#### **5.2 Saran**

Isolat *Bacillus* yang menghasilkan siderofor dalam penelitian ini dicoba untuk diaplikasikan dalam lingkungan yang terkendali untuk mengetahui aktivitasnya sebagai biofertilizer. Selain itu isolat tersebut juga dapat diaplikasikan sebagai agen bioremediasi di tanah tercemar Fe dalam kondisi yang terkontrol.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**



## DAFTAR PUSTAKA

Baby, V., Rajakumar, S., dan Ayyasamy, P. M. 2013. Reduction of Ferric Iron in Synthetic Medium Amended with Acetate As A Sole Carbon Source. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** Vol. 2 No. 12: 501-513.

Baby, V., Rajakumar, S., dan Ayyasamy, P. M. 2014. Prevalence and Screening of Potential Fe(III) and Mn(VI) Resistant Microorganisms in Industrial Soil. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology** Vol. 3: 7.

Berber, I. 2004. Characterization of *Bacillus* Species By Numerical Analysis of Their SDS-PAGE protein Profiles. **Journal of Cell and Molecular Biology** 3: 33-37.

Bhagwat, P. K., Kasabe, P. J., Jhample, S. B., dan Dandge, P. B. 2013. Friendly Bacteria Propping Up Legumes Development In Pesticide Contaminated Soil. **International Journal of Pharma and Bio Sciences** 4(3): 356-364.

Bholay, A. D., Priyanka, U. J., Borkhataria B. V., dan Dhalkari, M. V. 2012. Fluorescent Pseudomonads as Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Their Siderophoregenesis. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences** Volume 3: 27-32.

Cabaj, A. dan Kosakowska, A. 2009. Iron-dependent Growth of and Siderophore Production By Two Heterotrophic Bacteria Isolated from Brackish Water of The Southern Baltic Sea. **Microbiological Research** 164: 570-577.

Chojnacka, K. 2010. Biosorption and Bioaccumulation-The Prospects for Practical Applications. **Environment International** 36: 299-307.

Dong, F., Wang, L., Wang, C., Cheng, J., He, Z., Sheng, Z., dan Shen, R. 1992. Molecular Cloning and Mapping of Phenol Degradation Genes from *Bacillus stearothermophilus* FDTP-3 and Their Expression in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology** 58: No 8.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., dan Stackebrand, E. 2006. **The Prokaryotes: A Handbook on The Biology of Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria**. Springer Science Bussiness Media.

Elder, K., Baker, D., dan Ribes, J. 2005. **Infections, Infertility, and Assisted Reproduction**. Cambridge: Cambridge University Press.

Fathurrahmi. 2012. Analysis of Mineral Contents Ca, Mg, Fe and Na in Natural Bentonite Clay. **Jurnal Natural** 12: No 1.

Fgaier, H. & Eberl, H. J. 2011. Antagonistic Control of Microbial Pathogens Under Iron Limitations By Siderophore Producing Bacteria In A Chemostat Setup. **Journal of Theoretical Biology** 273: 103-114.

Fuangthong, M., Herbig, A. F., Bsat, N., dan Helmann, J. D. 2002. Regulation of The *Bacillus subtilis* *fur* and *perR* Genes by PerR: Not All Members of The PerR Regulon Are Peroxide Inducible. **Journal of Bacteriology**: 3276-3286.

Gillespie, S. H., 1994. **Medical Microbiology**. Oxford: Butterworth-Henemann.

Grossman, T. H., Tuckman, M., Ellestad, S., dan Ousburne, M. S. 1993. Isolation and Characterization of *Bacillus subtilis* Genes Involved in Siderophore Biosynthesis: Relationship between *B. subtilis* *sfp*<sup>0</sup> and *Escherichia coli* *entD* Genes. **Journal of Bacteriology** 175: 6203-6211.



Hansen, J. B., Doubet, R. S., dan Ram. 1984. Alginase Enzyme Production by *Bacillus circulans*. **Applied and Environmental Microbiology** 47: No 4.

Harisha, S. 2006. **An Introduction to Practical Biotechnology**. New Delhi: Laxmi Publications.

Harley dan Prescott. 2002. **Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition**. The McGraw-Hill Companies.

Harvie, D. R., Vilchez, S., Steggles, J. R., dan Ellar, D. J. 2005. *Bacillus cereus* Fur Regulates Iron Metabolism and Is Required for Full Virulence. **Microbiology** 151: 569-577.

Hu, Q. dan Xu, J. 2011. A Simple Double-Layered Chrome Azurol S Agar (SD-CASA) Plate Assay To Optimize The Production of Siderophore By A Potential Biocontrol Agent *Bacillus*. **African Journal of Microbiology Research** Vol. 5 (25): 4321-4327.

Husen, E. 2007. **Metode Analisis Biologi Tanah**. Balai Besar Litbang Sumberdaya Lahan Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A. Staley, J. T., dan Williams, S. T. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th edition**. Baltimore: Williams and Wilkins.

Hotta, K., Kim, C., Fox, D. T., dan Koppsisch, A. T. 2010. Siderophore-mediated Iron Acquisition in *Bacillus anthracis* and Related Strains. **Microbiology** 156.

Ingham, C. & Schneeberger, P. M. 2012. **The Role of New Technologies in Medical Microbiological Research and Diagnosis**. Netherlands: Bentham Books.

Iyer, A., Mody, K., dan Jha, B. 2005. Biosorption of Heavy Metals by A Marine Bacterium. **Marine Pollution Bulletin** 50: 340-343.

Johncy, R. M., Hemambika, B., Hemapriya, J., dan Rajeshkannan. 2010. Comparative Assessment of Heavy Metal Removal by Immobilized and Dead Bacterial Cells: A Biosorption Approach. **Global Journal of Environmental Research** 4 (1): 23-30.

Kanwal, R., Ahmed, T., Tahir, S. S., dan Rauf, N. 2004. Resistance of *Bacillus cereus* and *E. coli* Towards Lead, Copper, Iron, Manganese and Arsenic. **Pakistan Journal of Biological Sciences** 7: 6-9.

Kumar, R., Nongkhlaw, Acharya, C., dan Joshi, S. R. 2013. Growth Media Composition and Heavy Metal Tolerance Behaviour of Bacteria Characterized From The Sub-Surface Soil of Uranium Rich Ore Bearing Site of Domiasiat in Meghalaya. **Indian Journal of Biotechnology** Vol. 12: 115-119.

Lee, J. Y., Janes, B. K., Brian K. D. P. F., Pfleger, Bergman, N. H., Liu, H., Hakansson, K., Somu, R. V., Aldrich, C. C., Cendrowski, S., Hanna, P. C., dan Sherman, D. H. 2007. Biosynthetic Anaalysis of The Petrobactin Siderophore Pathwaay from *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology** 189: 1698-1710.

Louden, B. C., Haarman, D., dan Lynne, A. M. 2011. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. **Journal of Microbiology & Biology Education** Vol. 12: No.1

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., dan Clark, D. P. 2012. **Brock Biology of Microorganisms**. San Fransisco: Pearson Education.

Neilands, J. 1974. **Microbial Iron Metabolism: A Comprehensive Treatise**. London: Academic Press.

Nithya, C., Gnanalakshmi, B., dan Pandian, S. K. 2011. Assesment and Characterization of Heavy Metal Resistance in Palk Bay Sediment Bacteria. **Marine Enviornmental Research**: 283-294.

Noyes, Robert. 1994. **Unit Operations in Environtmental Engineering**. United Sates of America: Noyes Publications.

Pandey, R. K., Jarvis, G. G., dan Low, P. S. 2012. Efficient Synthesis of The Siderophore Petrobactin Via Antimony Triethoxide Mediated Coupling. **Tetrahedron Letters** 53: 1627-1629.

Parolo, M. E., Fernandez, L. G., Zajonkovsky, I., Sanchez, M. P., dan Baschini, M. 2011. Antibacterial Activity of Materials Synthesized From Clay. **Sciences Against Microbial Pathogens**.

Patel, A. K., Deshattiwar, M. K., Chaudhari, B. L., dan Chincholkar, S. B. 2008. Production, Purification, and Chemical Characterization of The Catecholate Siderophore from Potent Probiotic Strains of *Bacillus* sp. **Bioresource Technology** 100: 368-373.

Patil, S., Bheemaraddi, M. C., Shivannavar, C. T., dan Gaddad, S. M. 2014. Biocontrol Aactivity of Siderophore Producing *Bacillus subtilis* CTS-G24 Against Wilt and Dry Rot Causing Fungi in Chickpea. **IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)** Vol. 7, Issue 9 Ver. 1: 63-68.

Plowman, J. E., Loehr, T. M., Goldman, S. J., dan Sanders-Loehr, J. 1984. Structure and Siderophore Activity of Ferric Schizokinen. **Journal of Inorganic Biochemistry** 20: 183-197.



Prescott, Harley, Klein. 2008. **Microbiology, Seventh Edition**. New York: McGraw-Hill.

Retamales, J., Gonzales-Contreras, A., Salazar, S., Toranzo, A. E., dan Avendano-Herrera, Ruben. 2012. Iron Utilization and Siderophore Production By *Streptococcus phocae* Isolated From Diseased Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture** 364-365: 305-311.

Saraswati, R. & Yuniarti, E. 2007. **Metode Analisis Biologi Tanah**. Balai Besar Litbang Sumberdaya Lahan Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian.

Schaecter, M., Ingraham, J. L., dan Neidhardt, F. C. 2006. **Microbe**. Washington DC: ASM Press.

Schwartz M. 2009. *Bacillus anthracis*. <<http://www.bioquell.ie/>> [2 Januari 2015]

Schwyn, B dan Neilands, J. B. 1987. Universal Chemical Assay for The Detection and Determination of Siderophores. **Analytical Biochemistry** 160: 47-56.

Shaaban, M. T., Ibrahim, H. A. H., Abouhend, A. S., dan El-Moselhy, K. M. 2015. Removal of Heavy Metals from Aqueous Solutions Using Multi-Metals and Antibiotics Resistant Bacterium Isolated from The Red Sea, Egypt. **American Journal of Microbiological Research** Vol. 3 No. 3: 93-106.

Sheramati, I. & Varma, A. 2010. **Soil Biology: Soil Heavy Metals**. New York: Springer Heidelberg Dordrecht.

Sholikah, U. & Kuswyasari, N. D., 2012. Uji Potensi Genera *Bacillus* Sebagai Bioakumulator Merkuri. **Skripsi**. Jurusan Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.



Silva, B., Figueiredo, H., Quintelas, C, Neves, I. C, dan Tavares, T. 2008. Iron and Chromium Removal from Binary Solutions of Fe(III)/Cr(III) and Fe(III)/Cr(IV) By Biosorbents Supported on Zeolites. **Materials Science Forum** Vols. 587-588: 463-467.

Silva-Stenico, M. E., Pacheco, F. T. H., Rodrigues, J. L. M., Carrilho, E., dan Tsai, S. M. 2005. Growth and Siderophore Production of *Xylella fastidiosa* Under Iron-limited Conditions. **Microbial Research** 160: 429-436.

Sulistijowati, R. 2012. Potensi Filtrat *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4796 Sebagai Biopreservatif Pada Rebusan Daging Ikan Tongkol. **IJAS** Vol 2. No.2.

Sutariati, Kade, G. A., Widodo, Sudarsono, dan Ilyas, S. 2006. Karakter Fisiologis dan Keefektifan Isolat Rizobakteri sebagai Agens Antagonis *Colletotrichum capsici* dan Rhizobakteri Pemacu Pertumbuhan Tanaman Cabai. **Jurnal Ilmiah Pertanian KULTURA** 41: No 1.

Talaro, K. P. & Talaro, A. 2002. **Foundations in Microbiology, 4th Edition**. The McGraw-Hill Companies.

Varma, A. & Chincholkar, S. 2007. **Soil Biology: Microbial Siderophores**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Verma, V., Joshi K., dan Mazumdar, B. 2012. Study of Siderophore Formation in Nodule-Forming Bacterial Species. **Research Journal of Chemical Sciences** Vol. 2 (11): 26-29.

Wang, L. K., Chen, J. P., Hung, Y., dan Shammass, N. K. 2009. **Heavy Metals in The Environment**. Boca Raton: CRC Press.

Wilde, E. W. & Benemann, J. R. 1993. Bioremoval of Heavy Metals By The Use of Microalgae. **Biotechnol Adv** 11: 781-812.

Wittenwiler, M. 2007. Mechanisms of Iron Mobilization by Siderophores. **Review Journal**. Master Studies in Environmental Sciences.

Yudo, S. 2006. Kondisi Pencemaran Logam Berat di Perairan Sungai DKI Jakarta. **JAI** 2: No 1.

Zawadzka, A. M., Kim, Y., Maltseva, N., Nichiporuk, R., Fan, Y., Joachimiak, A., dan Raymond, K. N. 2009. Characterization of A *Bacillus subtilis* Transporter for Petrobactin, An Anthrax Stealth Siderophore. **PNAS** 106: 21854-21859.

Zulaika, E., Luqman, A., Arindah, T., dan Sholikah, U. 2012. Bakteri Resisten Logam Berat yang Berpotensi Sebagai Biosorben dan Bioakumulator. **Seminar Nasional Waste Management for Sustainable Urban Development**. Teknik Lingkungan, FTSP-ITS.

Zulaika, E., Sembiring, L., dan Soegianto, A. 2012. Characterization and Identification of Mercury-resistant Bacteria From Kalimas River Surabaya-Indonesia By Numerical Phenetic Taxonomy. **Journal of Basic and Applied Scientific Research** 2 (7): 7263-7269.

Zulaika, E., Sholikah, U., dan Prasetya, A. 2012. Potensi Bakteri *Bacillus* Sebagai Agensi Bioremediasi Limbah Industri yang Mengandung Merkuri. **Seminar Pemetaan Potensi dan Inovasi Ilmu Pengetahuan, Teknologi, Seni dan Budaya (IPTEKSB)**.

## Lampiran 1: Komposisi Medium NA dan NB

### A. Komposisi Medium NA (*Nutrient Agar*)/ 1L

- *Beef extract* (3 gr)
- Pepton (5 gr)
- Agar (12 gr)

Cara membuat: 20 gr NA dilarutkan dalam 1 L akuades, dihomogenkan dengan *hot plate stirrer*, dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

\*Untuk pembuatan NA-FeCl<sub>3</sub>, ditambahkan FeCl<sub>3</sub> sesuai konsentrasi yang dibutuhkan, misal: NA-FeCl<sub>3</sub> 1mg/L, berarti FeCl<sub>3</sub> ditambahkan sebanyak 1 mg untuk 1 L NA.

### B. Komposisi Medium NB (*Nutrient Broth*)/ 1L

- Lab Lemco Powder (1 gr)
- *Yeast extract* (2 gr)
- Pepton (5 gr)
- Sodium chloride (5 gr)

Cara membuat: 13 gr NB dilarutkan dalam 1 L akuades, dihomogenkan dengan *hot plate stirrer*, dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

## Lampiran 2: Pembuatan Medium Fe-CAS Agar (Schwyn & Neilands, 1978)

- **Blue Dye:**

***Solution I***

Dilarutkan 0,06 g Chrome Azurol S (Sigma-Aldrich) dalam 50 ml akuabides.

***Solution II***

Dilarutkan 0,0027 gr  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dalam 10 ml HCl mM.

***Solution III***

Dilarutkan 0,073 g HDTMA dalam 40 ml akuabides.

Ditambahkan 9 ml *Solution II* ke dalam *Solution I*, diaduk hingga homogen. Secara perlahan dimasukkan *Solution III* sambil diaduk perlahan dan terbentuk larutan berwarna biru. Diuang pada wadah yang telah dideferasi dengan 6 M HCl, disterilisasi dengan autofklaf selama 20 menit pada suhu  $121^\circ\text{C}$ , 2 atm.

- **Mixture Solution**

***Minimal Media 9 Salt Solution Stock***

Dilarutkan 15 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 g NaCl, dan 50 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  dalam 500 ml akuabides.

***Glucose Stock***

Dilarutkan 20 g glukosa ke dalam 100 ml akuabides. Disterilisasi menggunakan milipore  $0,2 \mu\text{m}$ , diletakkan di botol steril.

***Cassamino Acid Solution***

Dilarutkan 5 g Casaino Acid dalam 45 ml akuabides kemudian diekstrak dengan 3% 8-hydroxyquinoline dalam Cgloroform (v/v). Ekstrak air yang didapat kemudian disterilisasi menggunakan milipore  $0.2 \mu\text{m}$ , diletakkan di botol steril.

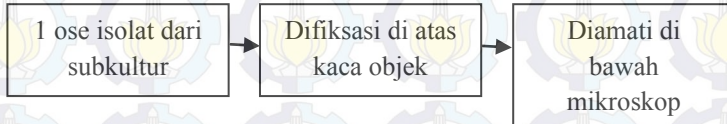
**Pembuatan CAS Agar**



Dilarutkan 100 ml M9 Salt pada 750 ml akuabides. Ditambahkan 32,24 g PIPES secara perlahan sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer, ditambahkan sedikit demi sedikit NaOH hingga PIPES larut sempurna atau hingga pH medium mencapai 6,8 kemudian ditambahkan 15 g Bacto Agar dan disterilisasi dengan autoklaf selama 20 menit. Setelah steril, dibiarkan hingga suhu turun ( $\pm 50-60^{\circ}\text{C}$ ) lalu ditambahkan dengan 30 ml Casamin Acid Solution dan 10 ml Glucose Stick kemudian secara perlahan ditambahkan 100 ml Blue Dye melalui tepi wadah sambil dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer. Setelah homogen, medium dituang ke dalam cawan Petri steril.

## Lampiran 3: Uji Rekonfirmasi

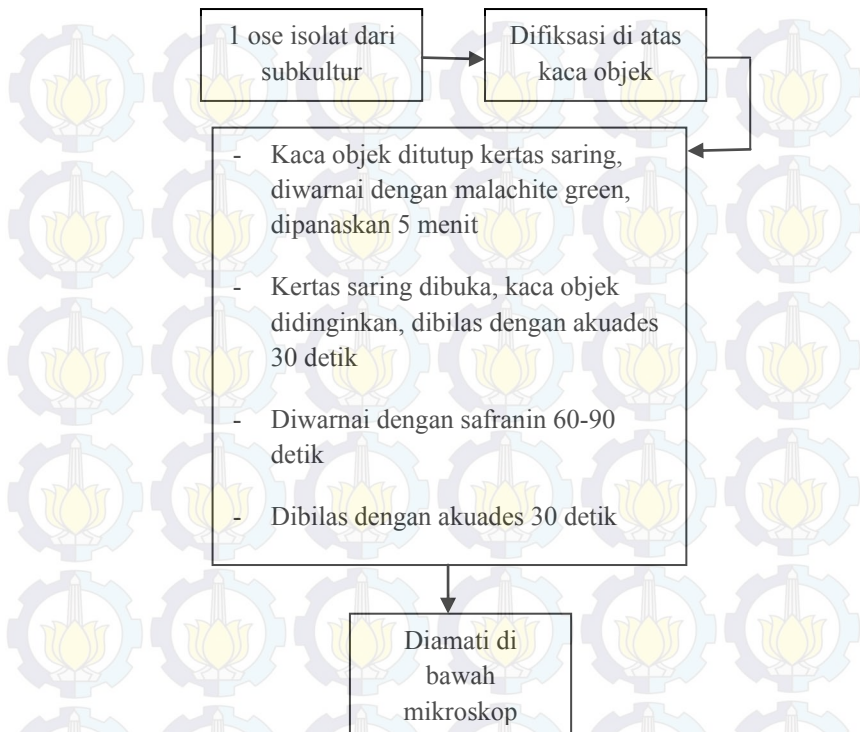
## A. Pengamatan Bentuk Sel



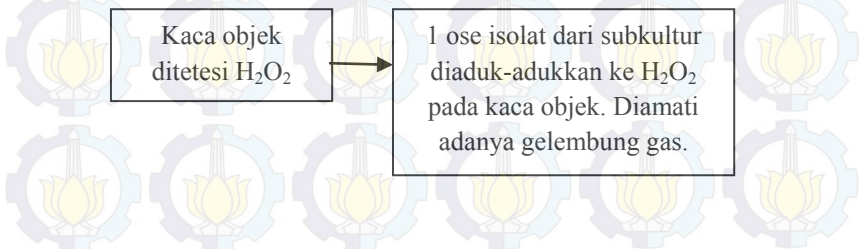
## B. Pewarnaan Gram



### C. Pewarnaan Endospora



### D. Uji Katalase



## Lampiran 4: Skema Kerja





**Uji Bioremoval Fe:**

Dibuat kultur starter. Lalu Kultur starter diinokulasi ke medium NB, diinkubasi sampai  $\mu$  jam, lalu dipapar logam Fe. Diinkubasi 24 jam. Ditetesi  $\text{HNO}_3$ , disentrifuge (4000 rpm, 30 menit), dipisahkan pelet dan filtrat. Filtrat diukur konsentrasi Fe-nya dengan AAS.

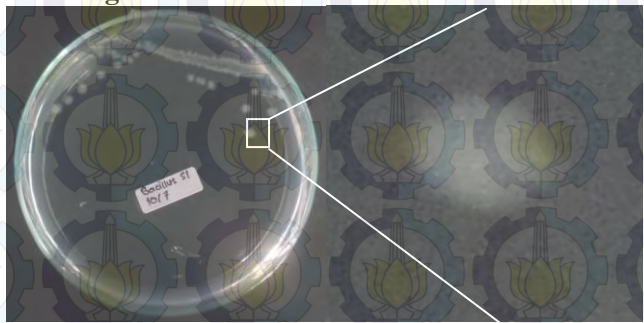
**Uji Viabilitas *Bacillus*:**

Kultur isolat yang telah terpapar logam dari bioremoval, diambil 100  $\mu\text{L}$ , diinokulasikan ke medium NA dengan metode pour plate. Diinkubasi 24 jam. Dihitung koloni yang tumbuh.




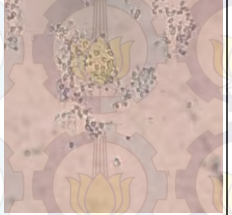
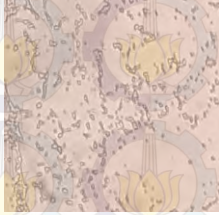
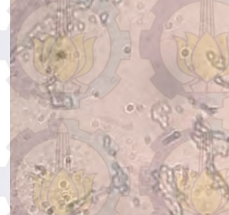
Lampiran 5: Dokumentasi Hasil

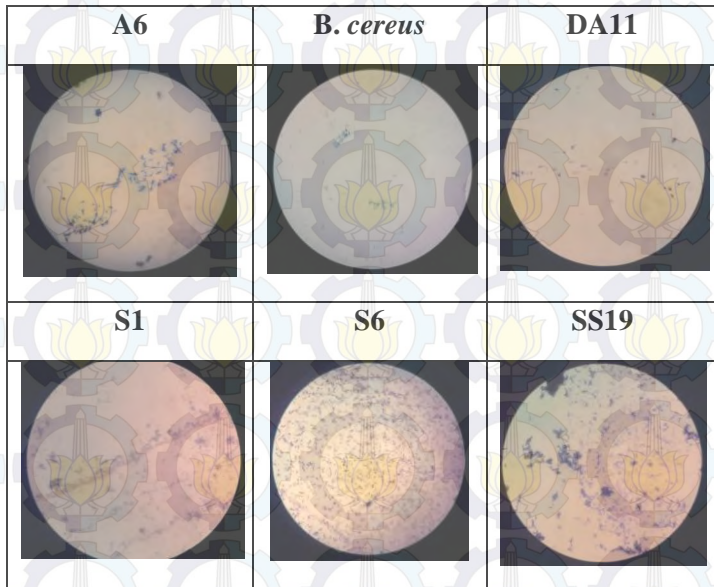
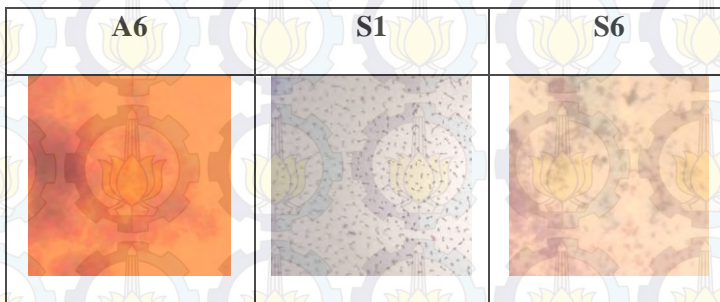
A. Uji Rekonfirmasi



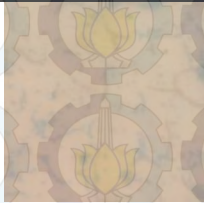
Morfologi Koloni *Bacillus* S1.



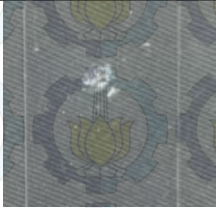
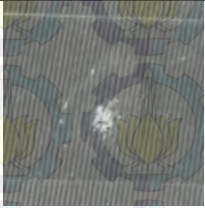




Bentuk Batang:

A6	<i>B. cereus</i>	DA11
		
S1	S6	SS19
		

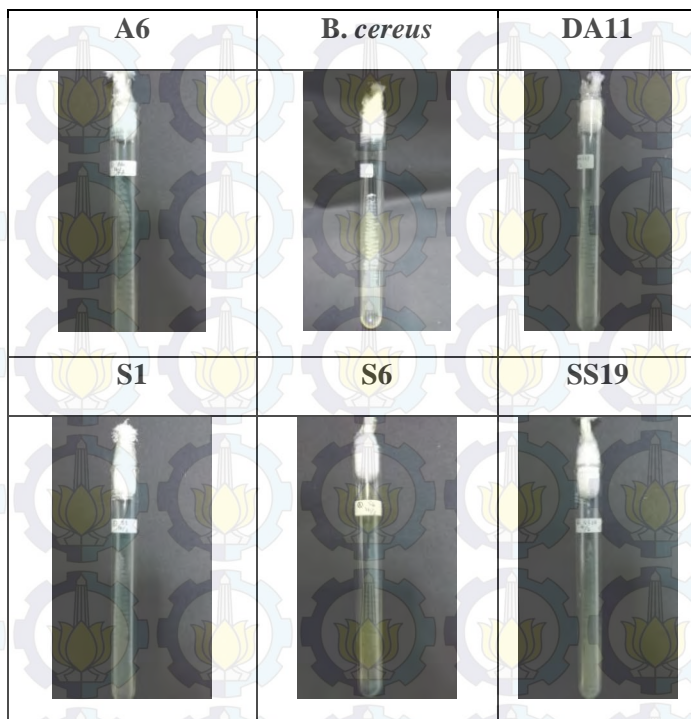
**Gram Positif:****Pewarnaan endospora:**

SS19	DA11	<i>B.cereus</i> ATCC 1179
		

Katalase Positif:

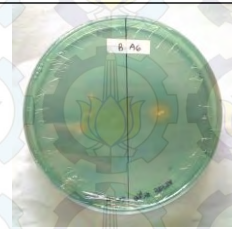
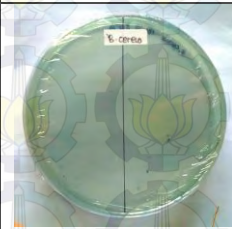
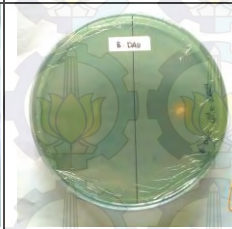
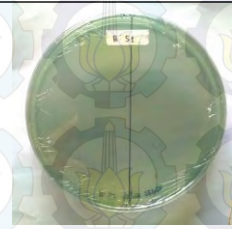
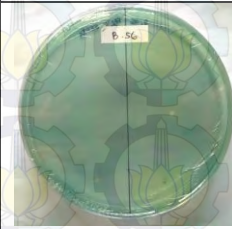
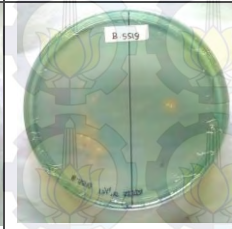
A6	<i>B. cereus</i>	DA11
		
S1	S6	SS19
		



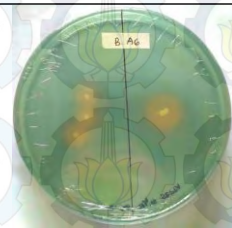
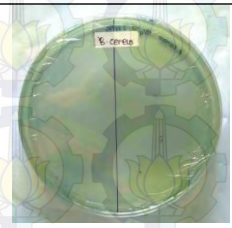
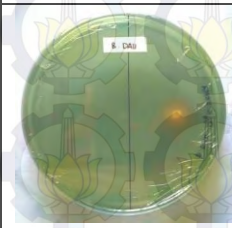
**B. Subkultur *Bacillus***

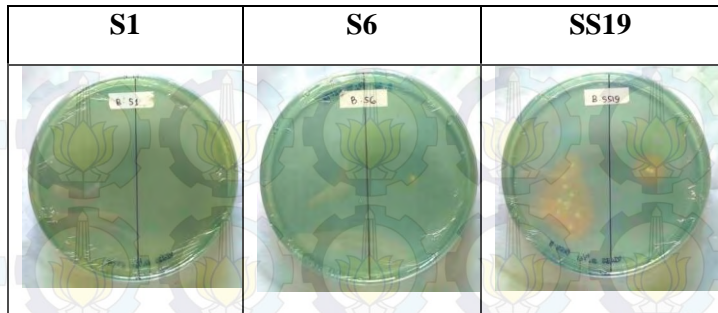
C. Penapisan Bakteri Siderofor

Inkubasi 24 Jam

<b>A6</b>	<b><i>B. cereus</i></b>	<b>DA11</b>
		
<b>S1</b>	<b>S6</b>	<b>SS19</b>
		

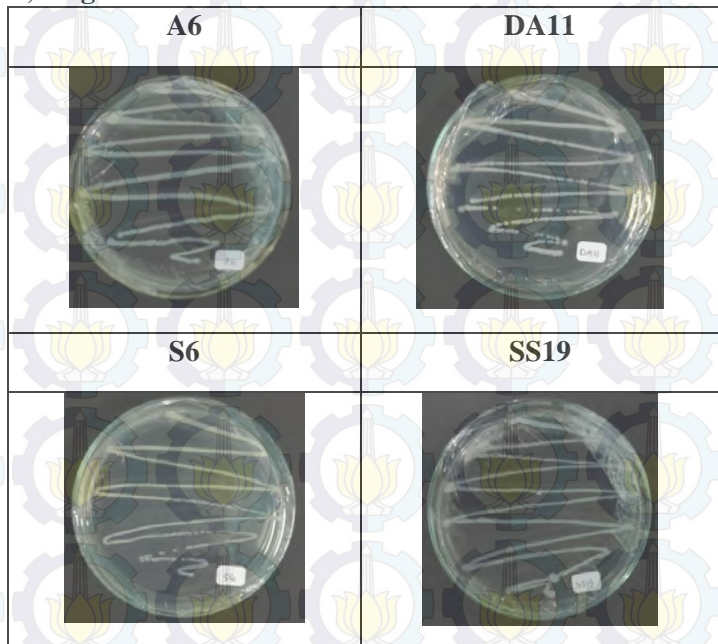
Inkubasi 48 Jam

<b>A6</b>	<b><i>B. cereus</i></b>	<b>DA11</b>
		


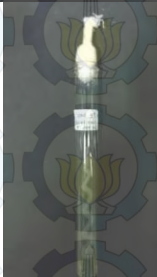




#### D. Hasil Uji Resistensi

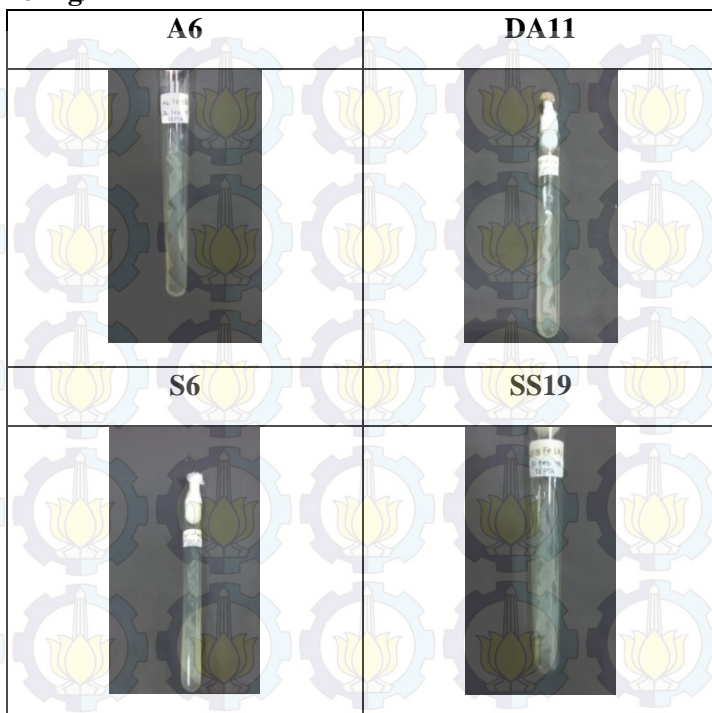
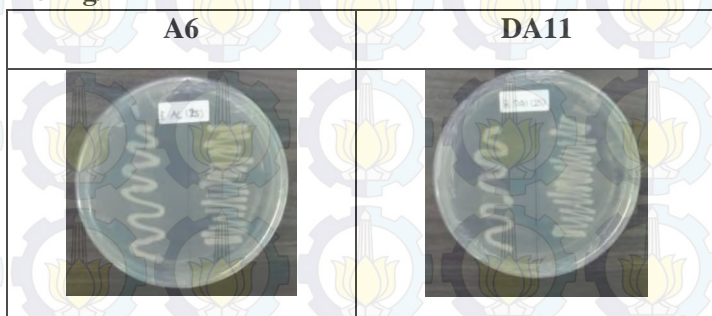
0,1 mg/L

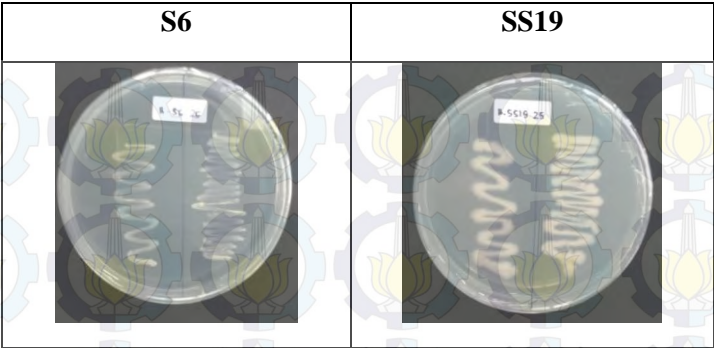


5 mg/L

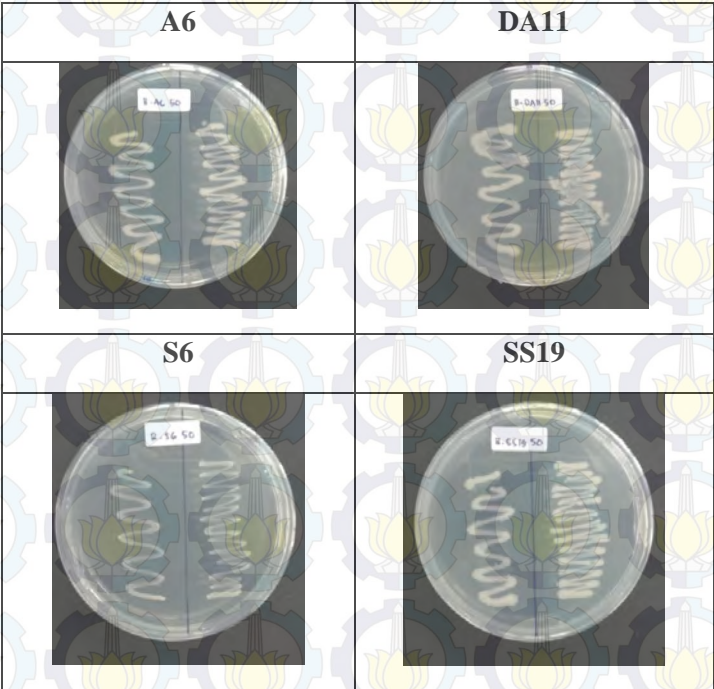
A6	DA11
	
S6	SS19
	

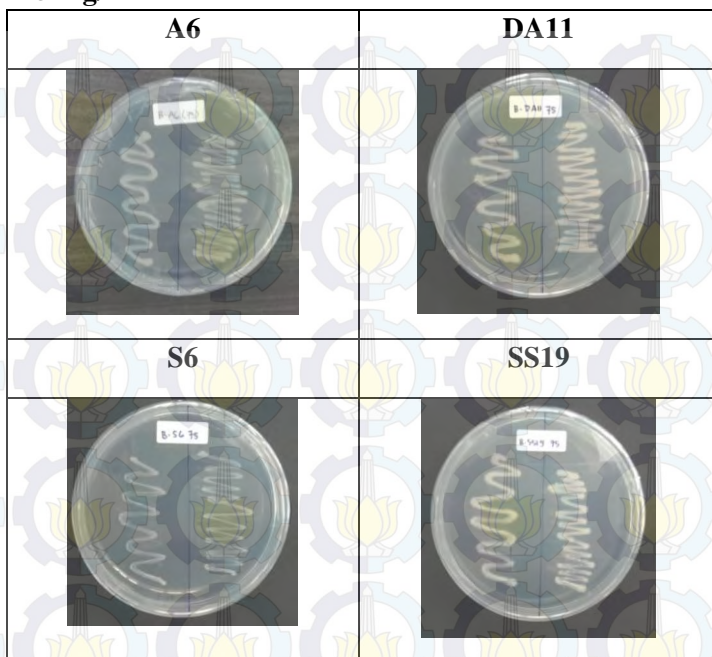
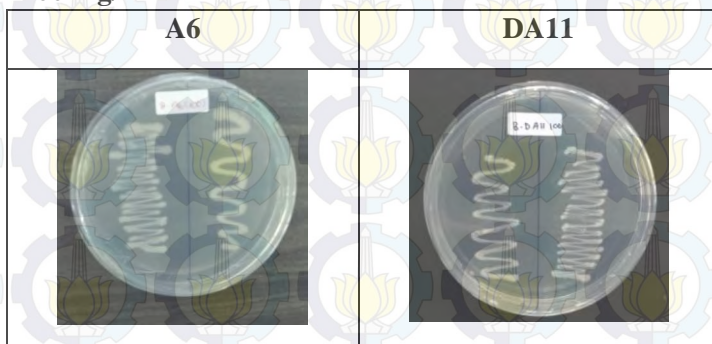


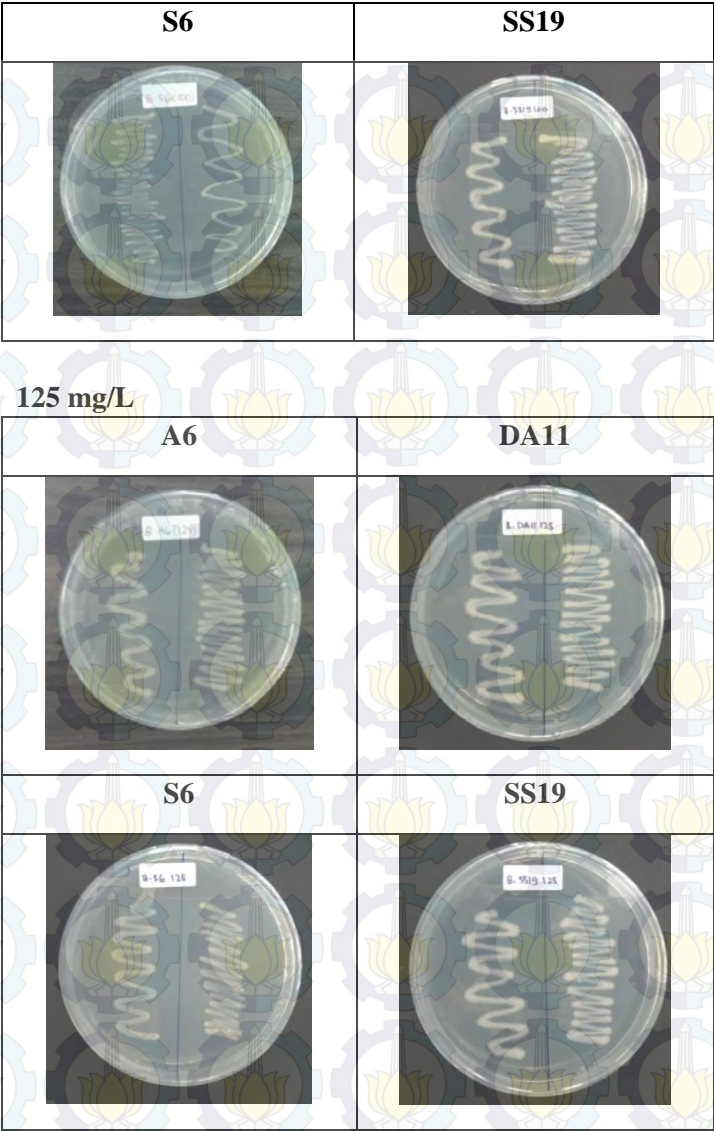
**8 mg/L****25 mg/L**



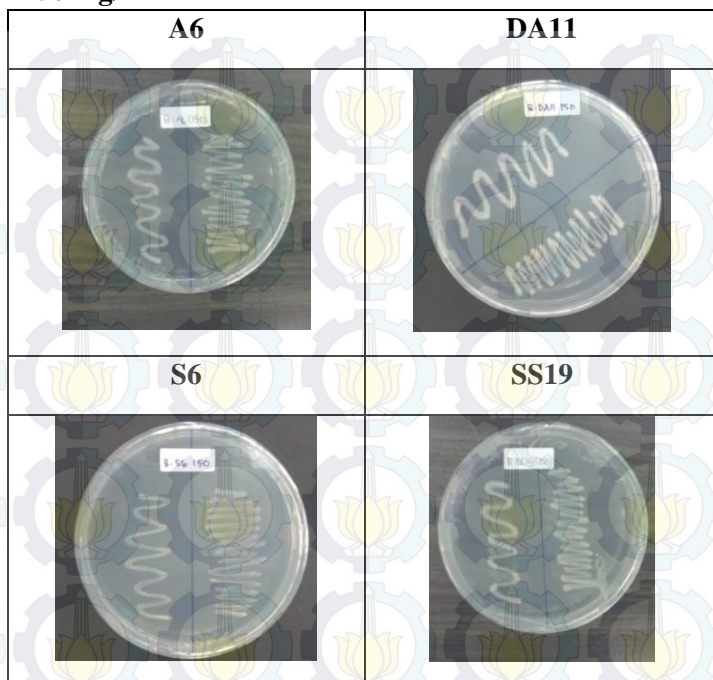
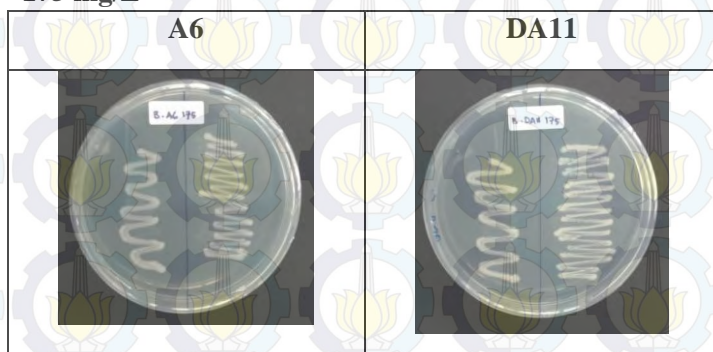
50 mg/L

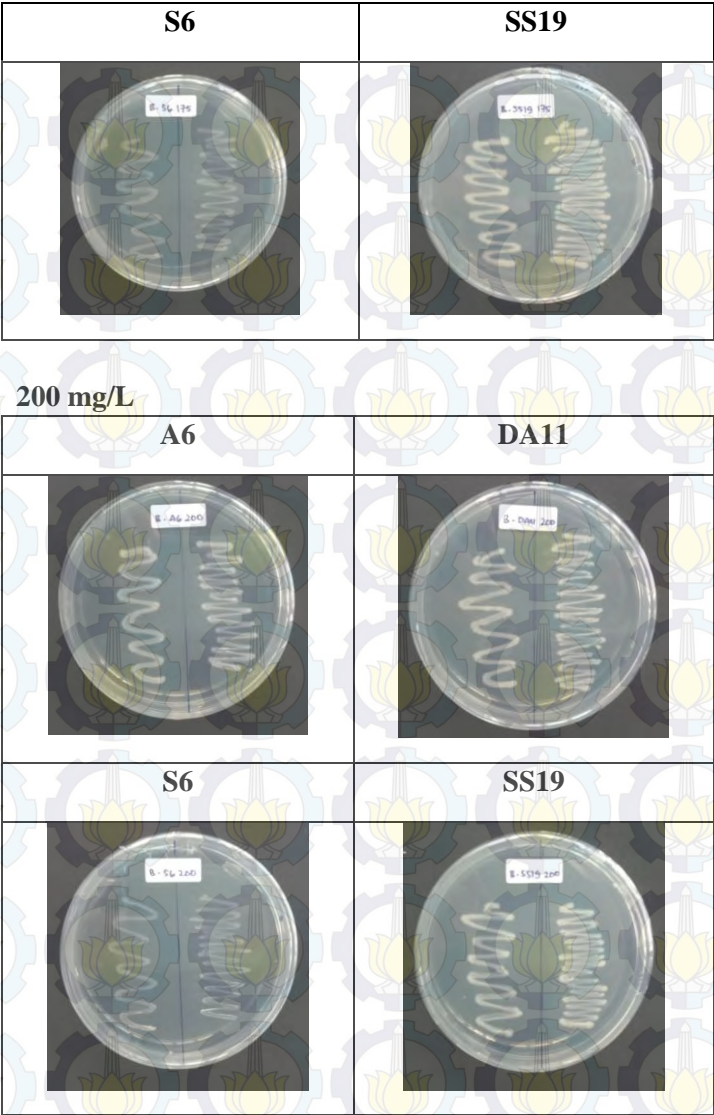


**75 mg/L****100 mg/L**


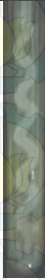

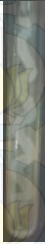





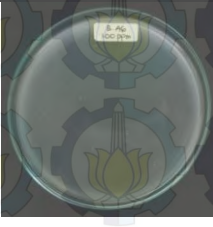

**150 mg/L****175 mg/L**

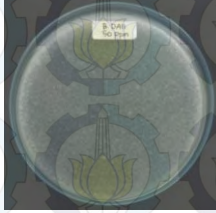

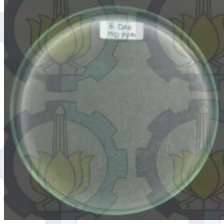

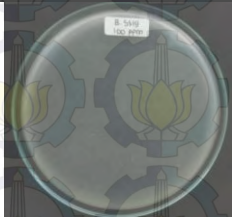
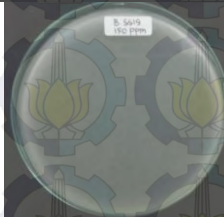


**300 mg/L**

A6	DA11
	
S6	SS19
	

### E. Uji Viabilitas

A6 (9,496 mg/L)	A6 (33,365 mg/L)	A6 (33,594 mg/L)
		

<b>DA11 (9,496 mg/L)</b>	<b>DA11 (33,365 mg/L)</b>	<b>DA11 (33,594 mg/L)</b>
		
<b>SS19 (9,496 mg/L)</b>	<b>SS19 (33,365 mg/L)</b>	<b>SS19 (33,594 mg/L)</b>
		



## Lampiran 6: Analisa Data MANOVA dengan Minitab

### ANOVA: Prosentase Efisiensi versus Isolat; Konsentrasi Fe

MANOVA for Isolat  
s = 1      m = 0,0      n = 1,0

Criterion	Test Statistic	F	DF		P
			Num	Denom	
Wilks'	0,68789	0,907	2	4	0,473
Lawley-Hotelling	0,45371	0,907	2	4	0,473
Pillai's	0,31211	0,907	2	4	0,473
Roy's	0,45371				

MANOVA for Konsentrasi Fe  
s = 1      m = 0,0      n = 1,0

Criterion	Test Statistic	F	DF		P
			Num	Denom	
Wilks'	0,03703	52,012	2	4	0,001
Lawley-Hotelling	26,00578	52,012	2	4	0,001
Pillai's	0,96297	52,012	2	4	0,001
Roy's	26,00578				

#### Grouping Information Using Tukey Method

Konsentrasi			
Fe	N	Mean	Grouping
2	3	79,373	A
3	3	78,670	A
1	3	50,946	B

Means that do not share a letter are significantly different.

## Lampiran 7: Hasil Analisis AAS



**BADAN PENGKAJIAN KEBIJAKAN IKLIM DAN MUTU INDUSTRI**  
**BALAI RISET DAN STANDARDISASI INDUSTRI SURABAYA**  
**LABORATORIUM PENGUJIAN DAN KALIBRASI**  
**BARISTAND INDUSTRI SURABAYA**

Jl. Jagir Wonokromo No. 360 Surabaya (60244), Telp. (031) 8410054, (031) 7000034, Fax. (031) 8410480  
<http://surabaya.bpkim.kemendag.go.id/>



---

**LAPORAN HASIL UJI**  
 No. 1594/LH/2N/2015

No. Analisa : P. 2058 s.d P. 2078  
 Contoh : Larutan NS  
 Merk :  
 Diterima Tanggal : 18 Mei 2015  
 Catatan Sample : >100 ml cairan dalam wadah botol plastik

Nama Pengirim : TRIO VERDIAN  
 Alamat : Pasar Kembang Gg. Kiliran No. 28  
 Tambaksari, SURABAYA - JAWA TIMUR

No	No Analisa	Kode	Parameter Fe (mg/L)	Metode Uji
1	P. 2058	B.A6.50.Fe	5.063	SNI 6989.4 : 2009
2	P. 2059	B.A6.50.Fe	4.926	SNI 6989.4 : 2009
3	P. 2060	B.A6.100.Fe	6.227	SNI 6989.4 : 2009
4	P. 2061	B.A6.100.Fe	7.067	SNI 6989.4 : 2009
5	P. 2062	B.A6.150.Fe	5.266	SNI 6989.4 : 2009
6	P. 2063	B.A6.150.Fe	7.896	SNI 6989.4 : 2009
7	P. 2064	B.DA.11.50.Fe	4.548	SNI 6989.4 : 2009
8	P. 2065	B.DA.11.50.Fe	4.532	SNI 6989.4 : 2009
9	P. 2066	B.DA.11.100.Fe	7.122	SNI 6989.4 : 2009
10	P. 2067	B.DA.11.100.Fe	5.926	SNI 6989.4 : 2009
11	P. 2068	B.DA.11.150.Fe	5.916	SNI 6989.4 : 2009
12	P. 2069	B.DA.11.150.Fe	5.339	SNI 6989.4 : 2009
13	P. 2070	B.SS.19.50.Fe	4.122	SNI 6989.4 : 2009
14	P. 2071	B.SS.19.50.Fe	4.758	SNI 6989.4 : 2009
15	P. 2072	B.SS.19.100.Fe	7.437	SNI 6989.4 : 2009
16	P. 2073	B.SS.19.100.Fe	7.525	SNI 6989.4 : 2009
17	P. 2074	B.SS.19.150.Fe	9.424	SNI 6989.4 : 2009
18	P. 2075	B.SS.19.150.Fe	9.152	SNI 6989.4 : 2009
19	P. 2076	KONTROL 50 ppm	9.496	SNI 6989.4 : 2009
20	P. 2077	KONTROL 100 ppm	33.365	SNI 6989.4 : 2009
21	P. 2078	KONTROL 150 ppm	33.594	SNI 6989.4 : 2009

Catatan: Parameter uji sesuai dengan permintaan

Surabaya, 19 Mei 2015

Deputi Penyelia  
Laboratorium Lingkungan

Deputi Wastand N. ST  
NIP. 198402212005022001



Pernyataan:  
 Laporan Hasil Uji hanya berlaku untuk tujuan pengujian.  
 Laporan Hasil Uji ini tidak dapat digunakan sebagai alat bukti.  
 Kode GOK : FIM - 7.05.02 - 10

Hal. 2 dari 2 (Page 2 of 2)

Industrialisasi Menuju Kehidupan Yang Lebih Baik

## BIODATA PENULIS



FMIPA ITS.

Penulis dilahirkan di Jombang pada tanggal 20 September 1993 sebagai anak ketiga dari tiga bersaudara, pasangan Sutahar dan Umi Nasiroh. Pada tahun 2011 penulis lulus dari SMA Negeri 2 Jombang dan pada tahun yang sama lulus seleksi masuk ITS melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri. Penulis memilih jurusan Biologi

Selama kuliah di Institut Teknologi Sepuluh Nopember penulis pernah bergabung dalam Departemen Media dan Hubungan Luar Himpunan Mahasiswa Biologi ITS sebagai Staf Divisi Media dan Pimpinan Redaksi serta *Layouter* Majalah Biogonal. Di antara aktivitas studi, penulis juga pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah Biokimia.

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya, penulis melakukan penelitian tugas akhir dengan judul **Potensi *Bacillus* Sebagai Bakteri Siderofor dan *Bioremoval* Logam Besi (Fe)** di bawah bimbingan Dr. Enny Zulaika dan Nur Laili, S. Si, M. Si.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

